Der Einfluß verschiedener Parameter auf biologische Membranen unter besonderer Berücksichtigung der Konformation der Proteine

– Eine infrarotspektroskopische Untersuchung –

Jenny Zerfowski

1980

Der Einfluß verschiedener Parameter auf biologische Membranen unter besonderer Berücksichtigung der Konformation der Proteine

- Eine infrarotspektroskopische Untersuchung -

Dissertation

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Jenny Zerfowski

Drakenburg

Dezember 1978

1. Berichterstatter Professor Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter Professor Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 30.9.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 1973 bis Dezember 1978 im Physikalisch-Chemischen Institut angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Georg Zundel, der das Thema dieser Arbeit anregte, gilt mein besonderer Dank für Diskussionen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Mehl, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, sei ebenfalls gedankt für Diskussionen und für die Unterstüzung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ferner möchte ich allen seinen Mitarbeitern für ihr freundliches Entgegenkommen bei meinen im Max-Planck-Institut durchgeführten Aufarbeitungen danken.

Weiter danke ich den Mitarbeitern der Werkstatt des Max-Planck-Institutes für die schnelle und exakte Anfertigung der von mir verwendeten Küvetten.

Herrn Röhrich danke ich für die schnelle Beschaffung von Materialien und Chemikalien.

Die Arbeit wurde teilweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, ohne deren finanzielle Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsangabe

		Seite
1. Einleitung		1
2. Experimenteller Teil		8
2.1	FMIR-Technik	8
2.2	FMIR-Küvette	10
2.2.1	Konstruktiver Aufbau	10
2.2.2	In der Küvette verwendete Dialysemembran	13
2.2.2.1	Verwendetes Material und Herstellung der Membran	13
2.2.2.2	Beschichtung mit Membranvesikeln	15
2.2.3	Dialysebedingungen	16
2.2.4	Vergleichsküvette	18
2.2.5	Experimentelle Schwierigkeiten bei den FMIR-Messungen	19
2.3	Transmissionsküvette	21
2.3.1	Konstruktiver Aufbau	21
2.3.2	Probenträger	21
2.3.3	Filmherstellung	23
2.3.4	Vorbereitung der Küvette für die Messung	23
2.4	Isolierung von Erythrozytenmembranen aus Rinderblut	25
2.5	Isolierung von Myelin aus dem Cerebralcortex des Schweines	25
2.6	Präparation von Rattenhirn und Subfraktionierung	26
2.6.1	Allgemeines zur Subfraktionierung	26
2.6.2	Präparation von Rattenhirn bis zur Fraktion P_2	27
2.6.3	Subfraktionierung von P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation	29
2.6.3.1	Allgemeines zur Dichtegradientenzentrifugation	29
2.6.3.2	Subfraktionen nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation	30

Seite

2.6.3.3 Subfraktionen nach der zweiten Dichtegradientenzentrifugation 30

2.6.3.4 Vorteile der zweiten Dichtegradientenzentrifugation 31

2.6.3.5 Subfraktionierung von P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation in Zonenrotor 34

2.6.3.6 Subfraktionierung von P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor 36

2.6.4 Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen 37

2.6.4.1 Bestimmung der Saccharosemolarität 37

2.6.4.2 Bestimmung des Proteingehaltes 38

2.6.5 Zur Auswahl der Dichtegradientenfraktionen für den weiteren Präparationsverlauf 38

2.6.5.1 Problematik bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit 38

2.6.5.2 In der vorliegenden Arbeit verwendete Fraktionen 40

2.6.6 Weiterer Präparationsverlauf mit den ausgewählten Fraktionen 45

2.6.6.1 Bei der Durchführung einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor 45

2.6.6.2 Nach abgeschlossener Subfraktionierung 45

2.6.6.3 Vorbereitung für die Dialyse 46

2.7 Beladung der biologischen Membranen mit Ionen 47

2.7.1 Verwendete Puffer 47

2.7.1.1 Erläuterungen zu den Puffern 47

2.7.1.2 Aufzählung der Pufferlösungen 47

2.7.2 Nach der alten für Transmissionsmessungen üblichen Methode 48

Seite

2.7.3 Nach der neuen Methode 48
2.8 Deuterierung der Membranen 49
2.9 IR-Spektrograph und Aufnahme der Spektren 49

3. Zur IR-spektroskopischen Analyse von Membranen 50
3.1 Die Konformationsanalyse von Proteinen 50
3.2 Die Analyse der Phospholipide 55
3.3 Erläuterungen zur Bandenlage von Amid-II nach Deuterierung 56

4. Messungen und Resultate mit Myelin 57
4.1 Erläuterungen zum Myelin 57
4.2 Untersuchungen an Myelin 59
4.2.1 Einfluß verschiedener Kationen bei pH und pD 7,4 60
4.2.1.1 Durchgeführte Messreihen 60
4.2.1.2 Resultate 60
4.2.2 Temperaturabhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen 66
4.2.2.1 Durchgeführte Meßreihen 66
4.2.2.2 Resultate 66
4.3 Diskussion der Resultate mit Myelin 72
4.4 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den in der Literatur beschriebenen 76

5. Messungen und Resultate mit Erythrozytenmembranen 78
5.1 Erläuterungen zu den Erythrozytenmembranen 78
5.2 Untersuchungen an Erythrozytenmembranen 78
5.2.1 Einfluß verschiedener Ionenmilieus im pH- bzw. pD-Bereich 7,0-7,4 79
5.2.1.1 Durchgeführte Meßreihen 79
5.2.1.2 Resultate 80
5.2.2 Temperaturabhängigkeit 88
5.2.2.1 Durchgeführte Meßreihen 88
5.2.2.2 Resultate 88
5.2.3 pH- und pD-Abhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen 91
5.2.3.1 Durchgeführte Meßreihen 91
5.2.3.2 Resultate 92

Seite

5.2.4 pD-Abhängigkeit bei zwei verschiedenen Konzentrationen von $CaCl_2$ im Kakodylatpuffer 112

5.2.4.1 Durchgeführte Meßreihen 112

5.2.4.2 Resultate 112

5.3 Diskussion der Resultate mit Erythrozytenmembranen 115

5.3.1 Diskussion der Resultate zum Einfluß verschiedener Kationen im pH- bzw. pD-Bereich 7,0-7,4 117

5.3.2 Diskussion der Resultate zur Temperaturabhängigkeit 122

5.3.3 Diskussion der Ergebnisse zur pH- und pD-Abhängigkeit der Erythrozytenmembranen 124

5.3.4 Diskussion der Resultate zur pD-Abhängigkeit bei zwei verschiedenen Konzentrationen von $CaCl_2$ 126

5.4 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden mit den in der Literatur beschriebenen 127

6. Messungen und Resultate mit Membranen aus Rattenhirn 131

6.1 Erläuterungen zu den aus Rattenhirn untersuchten Membranen 131

6.1.1 Myelin 131

6.1.2 Das Axon 131

6.1.3 Die Synapse 132

6.1.4 Mitochondrien 133

6.2 Veränderungen der Amid-I-Bande bei Zunahme von ß-Struktur 134

6.2.1 Durchgeführte Meßreihen 134

6.2.2 Resultate 134

6.2.3 Diskussion der Resultate 136

6.3 Untersuchung von im Ausschwingrotor subfraktionierten Membranen 136

6.3.1 K^+-Spektren von Membranen aus verschiedenen Dichtebereichen 137

6.3.1.1 Durchgeführte Meßreihen 137

6.3.1.2 Resultate 138

6.3.1.3 Diskussion der Resultate 144

6.3.2 Kationenabhängigkeit von Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen bei pH bzw. pD 7,4 148

Seite

6.3.2 Kationenabhängigkeit von Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen 148
6.3.2.1 Durchgeführte Meßreihen 148
6.3.2.2 Resultate 148
6.3.2.3 Diskussion der Resultate 154
6.4 Untersuchungen von im Zonenrotor subfraktionierten Membranen 156
6.4.1 Einfluß verschiedener Ionenmilieus auf die Membranen der verschiedenen Gradientenbereiche 156
6.4.1.1 Durchgeführte Meßreihen 156
6.4.1.2 Resultate 157
6.4.1.3 Diskussion der Resultate 177
6.4.2 Auswirkung der Dialysenreihenfolge auf den Spektrenverlauf 182
6.4.2.1 Durchgeführte Meßreihen 182
6.4.2.2 Resultate 182
6.4.3 Auswirkung des Einfrierens und Wiederauftauens auf den Spektrenverlauf 184
6.4.3.1 Durchgeführte Meßreihen 184
6.4.3.2 Resultate 184
6.4.4 Temperaturabhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen 185
6.4.4.1 Durchgeführte Meßreihen 185
6.4.4.2 Resultate 186
6.4.4.3 Diskussion der Resultate 191
6.5 Resultate der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen 193

7. Zusammenfassung 194

Anhang
Abkürzungen und Bemerkungen 201
Tabellen: A 1 204
A 2 210
A 3 212
A 4 214
A 5 215

	Seite
A 6	216
A 7	218
A 8	220
A 9	222
A 10	224
Literatur	228

1. Einleitung

Biologische Membranen haben eine Vielfalt von Funktionen zu erfüllen, welche in engem Zusammenhang mit ihrer Struktur stehen, die durch die verschiedenartigen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden sowie durch die Gegenwart von H_2O bedingt wird. Zwar ist bereits von vielen Membrantypen die Funktion bekannt, über die molekulare Feinstruktur sind jedoch noch viele Fragen offen. Deren Beantwortung ist seit vielen Jahren zentrales Forschungsthema einiger wissenschaftlicher Disziplinen.

Die lipoidale Natur der Membranen wurde bereits um die Jahrhundertwende von Overton erkannt (1). Detailliertere Erkenntnisse über die Struktur von Membranen gewannen Gorter und Grendel (1925) anhand von Experimenten mit Erythrozytenmembranen und postulierten eine Lipiddoppelschicht. Danielli und Davson stellten als Ergebnis funktioneller und physikochemischer Untersuchungen (1935) ein paucimolekulares Membranmodell auf.

In diesem begrenzen monomolekular angeordnete globuläre Proteine das aus mehreren Lipidschichten bestehende Innere der Membran, wobei die hydrophilen Gruppen der Lipidmoleküle nach außen zeigen (Vgl. Abb. 1b). 1953 erfolgte von Danielli und Davson (2) eine Modifizierung dieses Modells, indem sie die Anzahl der Lipidschichten auf zwei begrenzten. Aufgrund von Permeabilitätsstudien schlugen Stein und Danielli (3) drei Jahre später die Existenz wassergefüllter, von Proteinen gebildeter Poren vor, die sich quer durch die Membran erstrecken sollten. Damit wurden sie der Eigenschaft der biologischen Membranen gerecht, nicht nur für lipophile Gruppierungen, sondern auch für Wasser und kleine polare Moleküle durchlässig zu sein.

Daß ein dreischichtiger Aufbau nicht nur für die Erythrozytenmembran zutrifft, folgerte Robertson aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen vieler Membranen (4,5). Diesen zufolge scheinen ubiquitär alle Membranen diese trans-

versale Struktur zu besitzen. Lediglich der Querschnitt von ca 100 Angström variiert je nach Membranherkunft. Robertson forderte daher die Allgemeingültigkeit dieses Aufbaus und postulierte die "unit-membrane" (6). Für dieses Konzept modifizierte er das Danielli-Davson-Modell von 1935 dahingehend, daß die Mitte der Membran von einer einzigen Lipidschicht gebildet und gefaltete statt globulärer Proteine an deren Oberfläche befindlich sein sollen (4, Vgl. Abb. 1a).

Da das "unit-membrane"-Modell nur physikalische Membraneigenschaften wie Stabilität und hohen Widerstand berücksichtigt, wurden viele andere Modelle zur Membranstruktur entwickelt, mittels derer den biochemischen Vorgängen an Membranen, dem aktiven Transport und der Erregbarkeit Rechnung getragen wird.

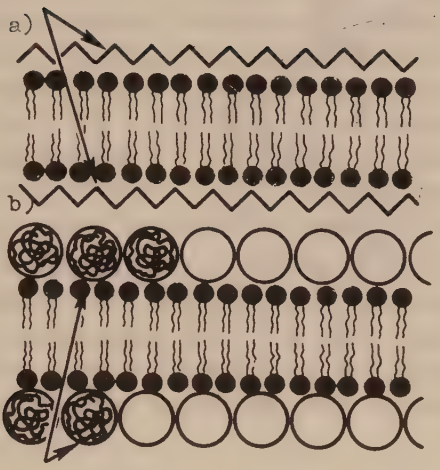
Die am wenigsten umstrittenen Modelle seien im folgenden kurz erwähnt. Einem zufolge sollen proteinhaltige Poren die Lipoiddoppelschicht ganz oder nur teilweise durchdringen (7-10). Im "Subunitmodell" wird die Membran als Aggregat identischer Untereinheiten angesehen. Diese werden meistens als Lipoidmicellen, welche von Proteinen umgeben sind, beschrieben (4,12,13).

Dem "Mosaik-Modell" zufolge sind globuläre Proteine verschieden tief in die Lipiddoppelschicht eingebettet (14,16,17), (Vgl. Abb. 2). Im "Fluid-Mosaik-Modell" schließlich werden die dynamischen Aspekte des "Mosaik"-Modells dadurch betont, daß Proteine und Lipoproteinkomplexe innerhalb der Membran beweglich sein sollen (17, Vgl. Abb. 3).

Alle diese Modelle beschäftigen sich primär mit den Struktureigenschaften, die ein Protein sowohl für die Lokalisierung in der Membran als auch für die von ihm zu erfüllenden Funktionen geeignet macht. Sie stimmen auch bezüglich des allgemeinen Aufbaus überein.

Die Aussagen wurden jedoch anhand der Untersuchungen stark vorbehandelter und fixierter Membranen, bei denen sich die morphologische Situation verändert haben kann,

Abb. 1a u. b:
Abb. 1a: Membranmodell nach Robertson (4).
Abb. 1b: Membranmodell nach Danielli-Davson (2).
(Aus: Lehninger, A., L. in: Biochemistry, World Publisher, Inc. (1970))



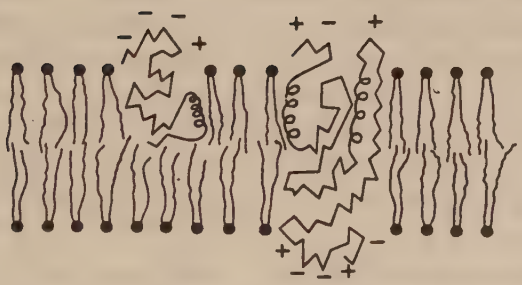
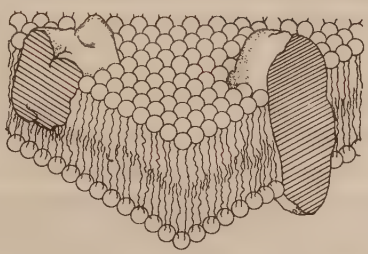


Abb. 2: "Mosaik-Modell" nach Singer (16)

Abb. 3: "Fluid-Mosaik-Modell" nach Singer (13)



gemacht.

Es ist aber von viel größerem Interesse, Membranen unter Beibehaltung der natürlichen Struktur zu untersuchen. Hierfür bieten sich vor allem physikalische Methoden wie Röntgenkleinwinkelstreuung, IR-, ORD- und CD-Spektroskopie an (14, 15,20,22,23,25-27). Mit deren Hilfe ist es möglich, Informationen sowohl über Lipid-Protein-Wechselwirkungen als auch über die Konformation der Proteine zu erhalten.

Die ß- oder auch Faltblattstruktur tritt entweder in paralleler oder antiparalleler (gleichläufiger oder gegenläufiger) Form auf. Die Peptidgruppen sind hierbei durch intermolekulare Wasserstoffbrücken, die senkrecht zur Achse des Makromoleküls gerichtet sind, verknüpft (Vgl. Abb. 4a u. b).

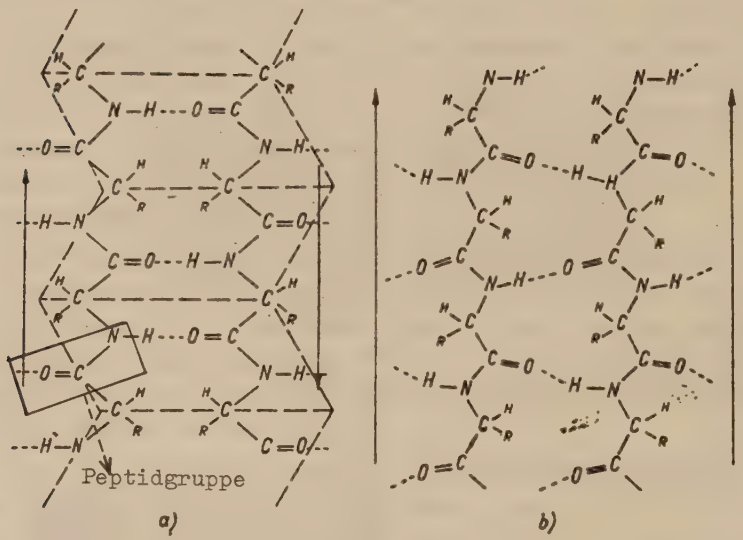
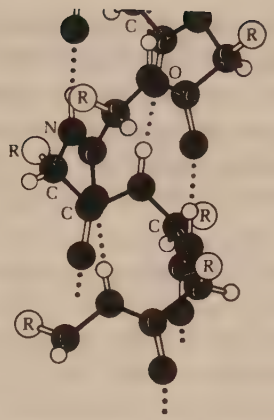


Abb. 4a und b: ß-Strukturen. a: antiparallel, b: parallel. (Aus: Autorenkollektiv in: Strukturuntersuchungen an Biopolymeren mit spektroskopischen und hydrodynamischen Methoden, Akademie-Verlag, Berlin)

Abb. 5: Modell einer α-Helix
(Aus: Lehninger, A.,L. in: Biochemistry, World Publisher, inc. (1970))



Die α-Helix hingegen ist durch intramolekulare Wasserstoffbrücken, die parallel zur Molekülachse verlaufen, verknüpft. Diese Struktur wird dadurch möglich, daß sich die Peptidketten wie um einen Zylinder wickeln (Vgl. Abb. 5). Auch hier existieren zwei Formen, nämlich die linksgängige und die rechtsgängige. Welche Struktur sich bildet, wird durch das Medium bedingt, in dem sich die Moleküle befinden.

Beim Zufallsknäuel (auch statistisches Knäuel) handelt es sich um einen Zustand ohne definierte Ordnung.

Die ß-Struktur kann von α-Helix und Knäuelzustand anhand von IR-Banden, die als Amid-I und II bezeichnet werden, Helix von Knäuelzustand mittels der ORD und CD-Spektroskopie unterschieden werden.

Mittels oben erwähnter Meßmethoden konnte gezeigt werden, daß bei den meisten Membrantypen die Proteine vorwiegend in α-Konformation vorliegen (40). Eine Ausnahme hiervon bilden unter anderem die Mitochondrienmembranen, bei denen Wallach viel ß-Konformation nachgewiesen hat (17,27). Der Anteil der ß-Struktur vergrößert sich mit der Zunahme des Elektro-

nentransports und verkleinert sich wieder, wenn eine Kopplung mit der oxydativen Phosphorylierung stattfindet (28). Auch bei den Erythrozytenmembranen kann der Anteil der Proteine in ß-Konformation vergrößert werden, wenn ein energieliefernder Prozess abläuft. In diesem Fall bewirkt u.a. die Zugabe von ATP und Mg^{2+} eine Konformationsumwandlung (29).

Hinsichtlich der Mechanismen, die für den Erregungsablauf in Nervenmembranen verantwortlich sind, gibt es verschiedene Theorien (30-33). Generell wird jedoch angenommen, daß sie mit Konformationsumwandlungen der Makromoleküle verknüpft sind (34-37). Bei der Veränderung der Konformation sollen nach Tasaki et al. (37) und Nachmansohn et al. (7) Kationen eine wichtige Rolle spielen.

Außer den Konformationsumwandlungen, die unter physiologischen Bedingungen ablaufen, wurden auch solche beobachtet, die nach Anwendung geeigneter physikalischer, chemischer oder biochemischer Methoden erfolgten (20,29,38-42).

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels infrarotspektroskopischer Messungen weitere Erkenntnisse über die Konformation von Proteinen in Membranen verschiedener Herkunft und Funktion sowie die Beeinflussung der Konformation durch verschiedene Parameter (pH-Wert, Ionenstärke, Ionenmilieu, Temperatur, Präparationsmethoden, Meßmethoden usw.) gewonnen werden.

Ausgangspunkt der Arbeit waren Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Zundel (43,44), die beinhalten, daß Nervenmembranenparäparate aus Rattenhirn, die für Axonmembranen gehalten wurden, in Gegenwart von Kaliumionen neben α- und/oder Knäuel-Konformation auch zusätzlich antiparallele ß-Struktur aufwiesen. Membranen, die mit Natrium- oder Calciumionen behandelt worden waren, enthielten keine ß-strukturierten Proteine.

Es sollte überprüft werden, ob die kaliumabhängige Konfomationsumwandlung reversibel ist. Hierzu mußte eine Küvette entwickelt werden, die es ermöglichte, die Ionen an den auf Probenträgern befindlichen Membranen nacheinander

auszutauschen und auf diese Weise mit ein und denselben Membranen den Einfluß verschiedener Ionen und Parameter auf die Proteinkonformation zu untersuchen.

Mittels dieser Küvette sollten auch langwierige Dialysezeiten auf ein Mindestmaß reduzierbar sein, um Spektren von möglichst frischem Material aufnehmen und die Reproduzierbarkeit dadurch erhöhen zu können.

2. Experimenteller Teil

2.1 FMIR-Technik (45,46)

Die FMIR-Technik ist die Weiterentwicklung des ATR-Verfahrens, dessen Grundlagen von Fahrenfort erarbeitet wurden (46).*

Das Prinzip beider Verfahren beruht darauf, daß das polychromatische infrarote Licht über ein Spiegelsystem so auf einen Kristall gelenkt wird, daß es durch diesen hindurch auf die Grenzfläche zwischen Kristall und Probe auftrifft. Bei geeigneter Wahl der Einfallswinkel tritt an der Phasengrenze Kristall/Substanz Totalreflexion der IR-Strahlung ein (Vgl. Abb. 6 c), vorausgestzt, daß die Probe keine Absorption zeigt. Im Absorptionsbereich der Probe dagegen wird die Intensität des reflektierten Lichtes im Vergleich zu der bei Totalreflexion abgeschwächt, wodurch Absorptionsbanden erhalten werden. Die Parameter, die bei diesen Techniken eine Rolle spielen, sind das Verhältnis der Brechungsindizes von Kristall/Substanz, der Einfallwinkel und die Frequenz der Strahlung.

Bei der ATR-Technik verwendet man hemizylindrische oder prismatische Kristalle, die nur eine Reflexion ermöglichen. (Vgl. Abb. 6a und b).

Bei der FMIR-Technik hingegen verwendet man trapezförmige Kristalle, die eine Mehrfachreflexion an der Grenzschicht ermöglichen (Vgl. Abb. 6c). Damit tritt auch Mehrfachabsorption bei der Probe auf und die Abschwächung der Intensität des eintretenden Lichtes erscheint wie die einer Probe von größerer Schichtdicke.

Bei der Wahl großer Einfallswinkel (45° und 60°) unterscheiden sich FMIR-Spektren nur geringfügig von Absorptionsspektren. Der Vorteil der FMIR-Methode ist, daß sie für wenig durchlässige Materialien geeignet ist, und sich vor allen Dingen dann anbietet, wenn von der zu untersuchenden Substanz, etwa biologischem Material, reproduzierbare Schichtdicken nur unter äußersten Schwierigkeiten

*FMIR bedeutet: Frustrated Multi Internal Reflections
ATR bedeutet: Attenuated Total Reflexions

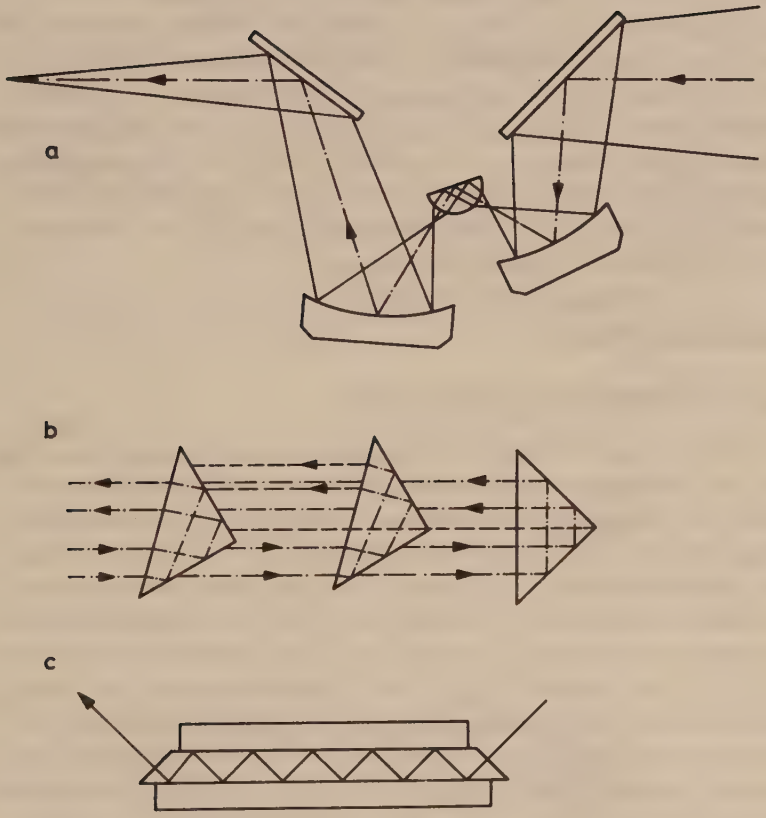


Abb. 6a-c: Anordnung von Kristall(en) für die ATR- und FMIR-Technik.
ATR-Technik: a) Strahlenverlauf in der Halbzylinderanordnung
b) Strahlenverlauf im Prisma
FMIR-Technik: c) Strahlenverlauf im trapezförmigen Kristall
(Aus: Bürner, K.: Zeitschrift für analytische Chemie 243, 68, (1968))

zu erhalten sind. Als optisches Medium für Proben mit hohem Brechungsindex, also auch für biologische Membranen, ist Germanium (n = 4) zu verwenden. Beim Aufbringen von Analysesubstanzen ist lediglich darauf zu achten, daß der Anpreßdruck reproduzierbar ist und gleich große Flächen des Kristalls mit dem zu untersuchenden Material in Berührung kommen. Die Vorteile der FMIR-Technik für die Untersuchungen biologischen Materials veranlaßten mich, für den zum Gitterspektrometer 325 der Firma Perkin-Elmer gelieferten FMIR-Zusatz eine Küvette zu konstruieren, die ich im folgenden als FMIR-Küvette bezeichnen werde.

2.2 FMIR-Küvette

2.2.1 Konstruktiver Aufbau (127)

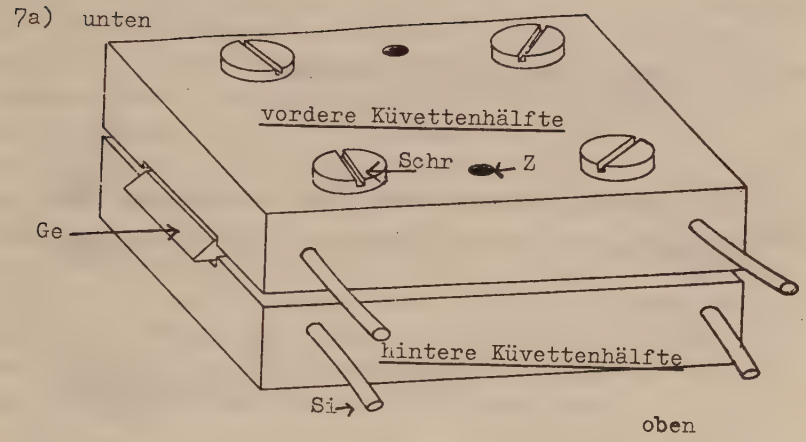
Die FMIR-Küvette (Abb. 7a,b und 8a) ist so konzipiert, daß sie zu Dialysezwecken verwendet werden kann. Dadurch besteht im Gegensatz zum früheren Verfahren (Vgl. S.21) die Möglichkeit, auf biologisches Material, das sich bereits auf dem Probenträger befindet, nacheinander verschiedene Parameter einwirken zu lassen. Die Maße der aus Plexiglas gearbeiteten Küvette sind auf die FMIR-Germaniumkristalle*** (52 x 18 x 2,2 mm/θ = 45°, 25 Reflexionen) der Fa. Harrick* abgestimmt. Die Germaniumplatte (Ge-Platte) liegt wie in den Abbildungen 7a und 8a dargestellt in der Küvette. Durch festes Anziehen der Schrauben wird der Kristall fest gegen die Vitondichtungen (Di), die 0,87 cm über das Plexiglas hinausragen, angepreßt, so daß zu beiden Seiten des Kristalls Dialysekammern von 5,3 cm^3 abgegrenzt werden. Winzige Poren (Po) verbinden die Kammern mit den Polyäthylenschläuchen, mittels derer die gewünschte Flüssigkeit ein- und ausströmt. Der Innendurchmesser der Schläuche beträgt 0,1 cm. Das Einkleben der Schläuche erfolgte mittels eines Cyanoacrylatklebers** . Nur mit dessen Hilfe war es möglich,

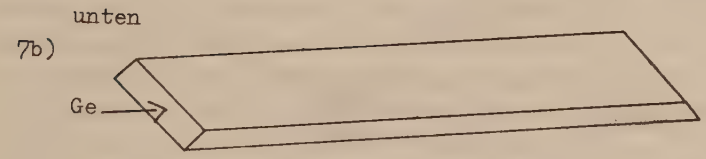
---

*Fa. Harrick Sci. Corp., Croton Dam Rd. Box 867, Ossining, N.Y. 10562

** Cyanoacrylatkleber, Terotop BE 100, der Fa. Teroson GmbH, Heidelberg

***Unter der Bezeichnung Germaniumkristalle wird immer eine Platte aus polykristallinem Germanium verstanden.





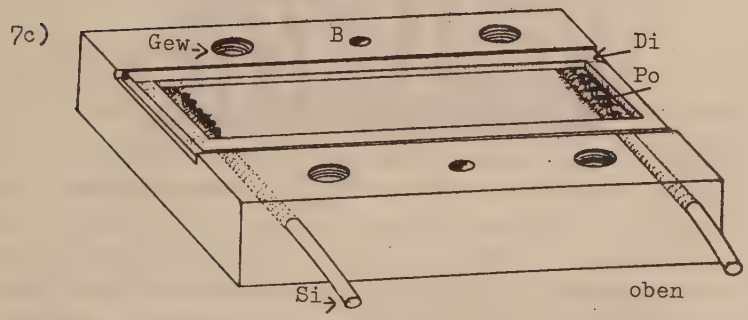


Abb. 7a: Gesamtansicht einer FMIR-Küvette mit Germaniumkristall
Abb. 7b: Germaniumkristall
Abb. 7c: Innenansicht einer Küvettenhälfte
Abkürzungen: Siehe bei Abb 8a und b.

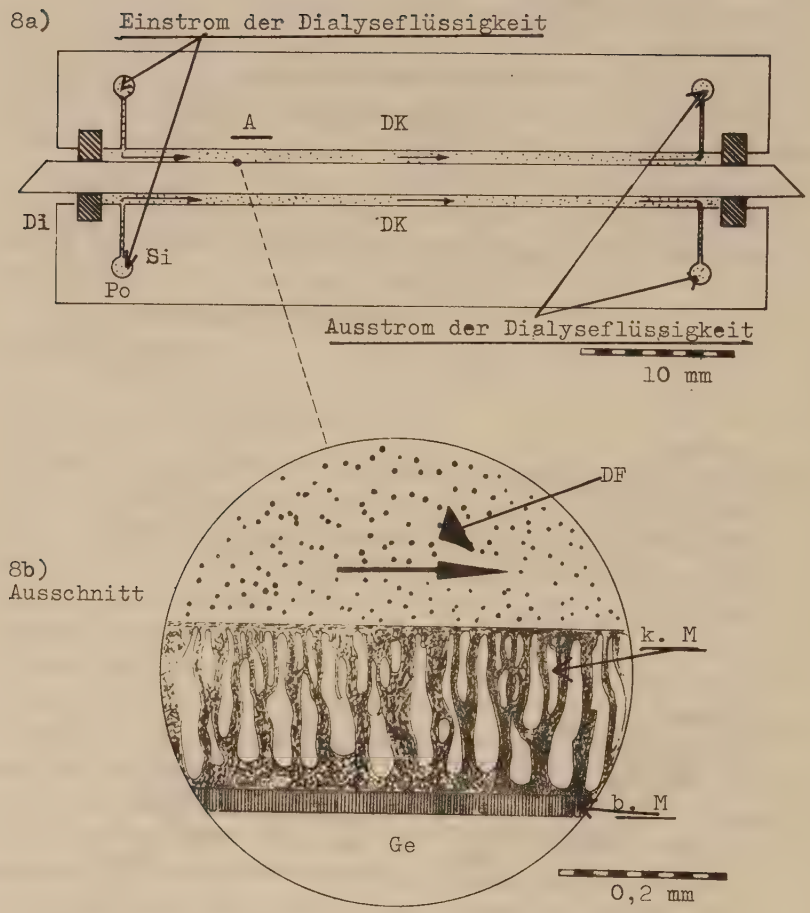


Abb. 8a: Längsschnitt durch eine mit Germaniumkristall und Membranen gefüllte Küvette

Abb. 8b: Vergrößerung des Ausschnittes A, um die Anordnung von Germaniumkristall, biologischer und künstlicher Membran sowie der Dialyseflüssigkeit zu demonstrieren.

Abkürzungen: Ge = Germaniumkristall, Di= Dichtung, DK = Dialysekammer, DF = Dialyseflüssigkeit, Po = Pore, B = Bohrung, Gew = Gewinde, Si = Silikonschlauch, Schr = Schraube, Z = Zapfen, k. M = künstliche Membran, b. M = biologische Membran

die Schläuche im Plexiglas zu fixieren. Zusätzlich dichtete er auch ausgezeichnet und dauerhaft ab. Die Aufgabe der Zapfen (Z), deren Enden in Abb. 7a gezeigt werden, ist zu verhindern, daß die beiden Hälften beim Zusammenbauen der Küvette zu abrupt auf den Germaniumkristall (Abb. 7b) zu liegen kommen und dieser dadurch zerbricht. Die für das Zusammenbauen der Küvette verwendeten Schrauben müssen sich längenmäßig unterscheiden. Sie sind für den unteren Teil der Küvette (Vgl. Abbildungen 7a und 7c) derart dimensioniert, daß es möglich ist, die Küvette mittels weiterer Schrauben an der FMIR-Halterung zu befestigen. Diese ist nach den Maßen der vom Hersteller gelieferten Zusätze gebaut worden, so daß mit Thermostatisierung gearbeitet werden kann.

Der Abb. 8 b ist zu entnehmen, wie die Membranvesikeln mittels der Dialysemembran, die gleichzeitig auch eine Trägerfunktion ausübt, auf dem FMIR-Kristall fixiert sind. Auf diesen werden beide Membranen, wenn die Dialysekammer luftblasenfrei und vollständig gefüllt ist, gleichmäßig gepreßt, was bei der FMIR-Technik unerläßlich ist. In dem Raum hinter der Dialysemembran kann die Flüssigkeit nach Belieben ausgetauscht und so das gewünschte Milieu an den Vesikeln eingestellt werden.

2.2.2 In der Küvette verwendete Dialysemembran

2.2.2.1 Verwendetes Material und Herstellung der Membran

Die Dialysemembran tritt an den Dichtstellen mit dem FMIR-Kristall in Kontakt und verursacht daher störende Banden. Daher mußte sie aus einem Material bestehen, das wenig oder keine Absorptionen im Bereich der Amid-I- und Amid-II-Banden zeigt (Vgl. S. 5). Fernerhin sollte es mir möglich sein, sie selbst herzustellen. Eine Polyacrylonitrilmembran ist geeignet, da deren schwache Banden im interessierenden Spektralbereich durch den Vergleichsstrahl kompensiert werden können. Diese Membran stellte ich auf folgende Weise her (128):

Zur Herstellung der Gießlösung für die asymmetrische Membran (Vgl. Abb. 8 b) werden unter starkem Rühren 15 Gew.-% Polyacrylonitril (BASF 190) bei etwa 100° C in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Hierbei ist darauf zu achten, daß wasserfrei und in einer Atmosphäre geringer Luftfeuchtigkeit gearbeitet wird. Wenn die Lösung abgekühlt ist, wird die Membran auf einer Glasplatte zu einem 0,2-0,3 mm dicken Film möglichst gleichmäßig ausgezogen. Hierfür wird die ca. 20 x 20 cm grosse Glasplatte an drei Rändern mit Tesaband von 0,2-0,3 mm Dicke beklebt (Vgl. Abb. 9). Von der wasserklaren, hochviskosen Lösung werden jeweils ca. 15 ml an einem Ende aufgegeben und mit einem V_4A Metallstab* bei einer Geschwindigkeit von etwa 10 cm/sec ausgezogen. Nach einer ungefähr einminütigen Verdunstungsperiode wird die Glasplatte mit dem Film in ein Wasserbad (Raumtemperatur) getaucht. Nach 1-2 Minuten fällt der Film aus und löst sich vom Glas.

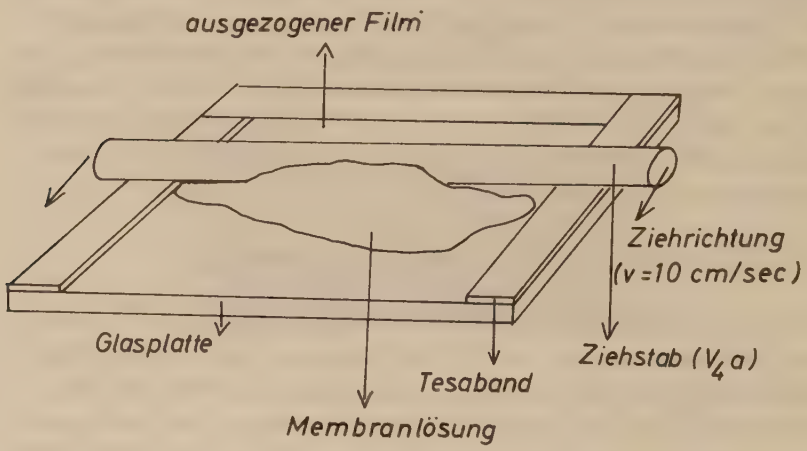


Abb. 9: Ausziehen der Polymerlösung auf der Glasplatte

---

*Was den Metallstab betrifft, so muß dieser stets gründlich gereinigt und so aufbewahrt werden, daß er keine Kratzer bekommt. Denn diese würden ungleichmäßige oder rissige Filme verursachen.

Nach Herstellung werden die Filme in Wasser aufbewahrt, da sich beim Trocknen ihre Eigenschaften verändern. Das Wasser muß während der ersten Stunde des öfteren erneuert werden, damit alles Lösungsmittel aus der Membran entfernt wird. Die Membranen müssen feucht verarbeitet werden. Filme für Messungen in D_2O werden schnell mit dem Fön getrocknet, dann sofort in deuteriertes Wasser gelegt und darin aufbewahrt.

Eine so hergestellte Membran ist asymmetrisch aufgebaut, und sie besitzt ihre sogenannte aktive Schicht an der Seite der ausgezogenen Lösung, die dem Wasser zugewandt war. Auf dieser Seite müssen die Membranvesikeln aufgetragen werden. Die Struktur einer solchen Membran ist in Abb. 8b dargestellt.

2.2.2.2 Beschichtung mit Membranvesikeln

Für das Beschichten der Dialysemembran mit den Membranvesikeln schien mir zunächst die Überdruckfiltration eine geeignete Methode zu sein. Entsprechende Vorversuche führte ich mit den leicht zu präparierenden Erythrozytenmembranen (Vgl. S.25) und dem Filtrationsgerät SM 1625 der Fa. Sartorius* durch. Hierbei ersetzte ich die käuflichen Membranfilter durch die Polyacrylonitrilfolie. Leider gelang es bei keinem Druck, selbst beim höchstzulässigen von 10 atü nicht, die Erythrozytenmembranvesikeln als brauchbaren Film niederzuschlagen. Geringer Überdruck reichte nicht aus, bei hohem verstopften offenbar die Poren des Filters.

Daraufhin entschloß ich mich, die Membranvesikeln durch Ultrazentrifugation abzuzentrifugieren, um dann die dadurch gewonnene viskose Masse wie eine Paste mit dem Spatel auf die Dialysemembran zu streichen.

Bei diesem Verfahren kamen mir die Vorteile der FMIR-Technik insofern zugute, daß nur der Anpreßdruck der Substanz auf den FMIR-Kristall und eine geringe Eindringtiefe des Strahlengangs in das zu untersuchende Medium von Be-

---

* Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, 3400 Göttingen, Postfach 142

deutung sind. Außerdem verteilten sich die Vesikeln durch den Flüssigkeitsdruck in der Küvette zu einer relativ gleichmäßig dicken Schicht.

Als optimale Zentrifugationsbedingungen, die für Myelin und Erythrozytenmembranen gleichermaßen anwendbar waren, ermittelte ich 1 h bei 100 000 g (4° C) im Ti 50 Rotor der Beckman Ultrazentrifuge L 5 50*. Wenn die Membranen aus Rattenhirn, die mittels verschiedener Methoden isoliert wurden, am Ende des Präparationsverlaufs nicht in der benötigten Konsistenz vorlagen, wurde mit ihnen ebenso verfahren.

2.2.3 Dialysebedingungen

Bei Messungen wässriger Proteinsuspensionen muß im allgemeinen in D_2O gearbeitet werden, insbesondere dann, wenn Veränderungen der Amid- Banden, die Aufschluß über den Konformationszustand der Proteine geben, beobachtet werden sollen. Denn die H_2O-Scherenschwingung des Wassers absorbiert in dem Wellenzahlenbereich, in dem die Amid-I-Bande liegt (67,68,106).

Da Vesikelsuspensionen mehr Wasser als Vesikelfilme enthalten, war es im Falle der FMIR-Küvette im Gegensatz zu Messungen mit der Transmissionsküvette notwendig, vorwiegend D_2O zu verwenden. Aus Kostengründen ergab sich hiermit das Problem, mit sehr geringen Puffermengen eine ausreichende Veränderung des Ionenmilieus an den biologischen Membranen bewerkstelligen zu können.

In Anbetracht der Tatsache, daß bei Diffusionsvorgängen der Zeitfaktor von großer Wichtigkeit ist, muß der Puffer im allgemeinen mit niedriger Geschwindigkeit durch die Küvette gepumpt werden. Je weniger Dialyseflüssigkeit zur Verfügung steht, desto mehr muß die Geschwindigkeit gedrosselt werden.

Lange Dialysezeiten wiederum waren bei meinen Versuchen

---

*Beckman Instruments, München

von Nachteil, weil die Zeitspanne zwischen den Aufnahmen der zu einer Versuchserie gehörenden Spektren sehr groß wurde. Dadurch verringerte sich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, und es konnten pro Präparation weit weniger Versuche durchgeführt werden. Denn bereits nach wenigen Tagen bewirken Enzymaktivität und Bakterienfraß eine Veränderung von biologischem Material. Daher war es bei einer langen Dialysedauer nicht einmal möglich, eine ganze Versuchsserie mit einem einzigen Membranpräparat durchzuführen.

Die optimalen Dialysebedingungen, die es gewährleisten, daß sich bereits nach kurzer Dialysedauer das gewünschte Ionenmilieu an den Membranvesikeln einstellt, ermittelte ich anhand des H_2O-D_2O-Austausches an den Membranen. Den Austausch wollte ich ebenfalls in der Küvette durchführen, anstatt nach folgendem umständlichen Verfahren, das üblicherweise Anwendung findet, zu arbeiten:

1. Membranvesikeln werden abzentrifugiert (1/2 h bei 100 000 g/ 4° C)
2. Sie werden unter starkem Rühren in etwas D_2O suspendiert und eine halbe Stunde bei 4° C stehengelassen.
3. Sie werden erneut zentrifugiert (1/2 h bei 100 000 g/ 4° C)
4. Die Schritte 2 und 3 werden dreimal wiederholt.

Das Ausmaß des H_2O-D_2O-Austausches in der Küvette konnte an den Banden der OH (OD)-Streckschwingung des Wassers beobachtet werden. Sie liegen bei 2500 cm^{-1} für D_2O und bei 3395 cm^{-1} für H_2O (129). Daher wurde die Dialyse in Intervallen von etwa einer Stunde unterbrochen, um anhand der Spektren zu ermitteln, wann der Sättigungswert des Austausches erreicht war. Durch die Struktur der Membranen bedingt war ein vollständiger Austausch nicht möglich (48).

Um die optimalen Dialysebedingungen für den H_2O-D_2O-Austausch zu ermitteln, pumpte ich zunächst D_2O mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/h je Küvettenkammer hindurch. Nach etwa 8 Stunden war die Austauschsättigung erreicht. Daraufhin arbeitete ich bei entsprechend verkürzter Zeit

mit größerer Durchflußgeschwindigkeit. Dabei betrug die Temperatur stets 4° C. Als Ergebnis dieser Versuche ergab sich, daß drei Stunden Dialyse bei einer Pumpgeschwindigkeit von 4 ml/h die optimalsten Bedingungen waren. Sie wurden auch der Anforderung gerecht, mit kleinen Flüssigkeitsmengen auskommen zu müssen.

Nun war allerdings noch zu klären, ob diese Werte auch für den Austausch von Ionen ihre Gültigkeit besaßen. Um diese Frage zu beantworten, führte ich zwei Parallelversuche mit Myelin durch. Bei einem Versuch dialysierte ich Myelin in Dialyseschläuchen nacheinander gegen Tris-EDTA- und Na^+-Kakodylat-Puffer (Vgl. S.48) Danach wurde das Myelin für eine Messung in der FMIR-Küvette vorbereitet (Vgl. S.16). In dem anderen Versuch führte ich alle Dialysen in der Küvette durch. Dabei wurden die Bedingungen angewendet, die für den H_2O-D_2O-Austausch ermittelt worden waren. Der Vergleich der entsprechenden Spektren bewies die Gleichwertigkeit beider Dialyseverfahren. Daher war wegen der Zeitersparnis von mehreren Tagen das Dialysieren in der FMIR-Küvette der üblichen Methode vorzuziehen.

2.2.4 Vergleichsküvette

Mit der mit H_2O bzw. D_2O gefüllten Vergleichsküvette werden die Absorptionen von H_2O bzw. D_2O sowie andere störende Effekte, die von der Substanzküvette und der Polyacrylonitrilfolie herrühren, kompensiert. Da in ihr ebenfalls die FMIR-Kristalle der Fa. Harrick (Vgl. Abb. 7b) benutzt werden, ist sie abgesehen von kleinen Änderungen wie die Substanzküvette konstruiert.

Die Änderungen beziehen sich im wesentlichen auf die Grundfläche der Dialysekammer. Diese verkleinerte ich mittels eines schmalen Streifens 0,2 mm starker Platin-Folie*. Die Folie wurde entlang der Vitondichtung auf den Boden der Küvettenkammer geklebt. Hierfür verwendete ich den Cyanoacrylatkleber, der auf Seite 10 erwähnt wird.

---

*Fa. Degussa, Leipziger Str. 10, 6450 Hanau

Diese Maßnahme war daher notwendig, weil die Fläche des FMIR-Kristalls in der Vergleichsküvette mit relativ mehr Wassermolekülen als in der Substanzküvette in Kontakt kam. Dadurch ergab sich eine erhebliche Überkompensation. Da eine unmittelbare Berechnung des Wassergehaltes in den Membranen nicht möglich ist, variierte ich die Größe der Platinfolie für die Aufnahme zahlreicher Spektren. Hierbei versuchte ich den D_2O-Untergrund des D_2O-Myelins optimal zu kompensieren. Bei diesen Versuchen diente die Bande der OD-Streckschwingung des deuterierten Wassers, die sich bei 2500 cm^{-1} befindet, als Maß. Mehrere Experimente zeigten, daß die Folienfläche, mit welcher der beste Abgleich bei Myelin gelang, auch für die anderen von mir untersuchten Membranen unverändert bleiben konnte. Zusätzlich ergaben diese Versuche, daß die Menge von H_2O, welche in den Membranvesikeln nicht gegen D_2O austauschbar war (22,48), beim Füllen der Vergleichsküvette mit D_2O vernachlässigt werden konnte.

Mit der Platinfolie gelang es auch, störende Banden, die vom Küvettenmaterial herrührten, zu beseitigen. So deckte ich die Küvettenseiten, aus denen die Lichtein- und Lichtaustrittsflächen des FMIR-Kristalls hinausragen, damit ab. Desgleichen wurden auf die Flächen, die sich von den Schmalseiten der Dialysekammern zu den Küvettenrändern erstrekken, Platinfolie geklebt.

Die Kompensation der durch die Dialysemembran erzeugten Banden konnte dadurch erzielt werden, daß in der Vergleichsküvette die Vitondichtungen mit Polyacrylonitrilfolie verdeckt wurden*. Die Folien in der Substanz- und Vergleichsküvette mußten entweder beide deuteriert oder hydratisiert sein.

2.2.5 Experimentelle Schwierigkeiten bei den FMIR-Messungen

Bei den Berechnungsgrundlagen der ATR-Technik wurden fixierte Spiegel und ein definierter Einfallswinkel voraus-

---

*Denn der Germaniumkristall und die Folie berühren sich nur an den Dichtstellen unmittelbar.

gesetzt. Dementsprechend sind die ATR-Zusätze mit Vorrichtungen ausgerüstet, die es ermöglichen, die Winkel reproduzierbar einzustellen und dadurch leicht den bestmöglichen Abgleich zu erzielen (50). Bei Anwendung der FMIR-Technik sind in den meisten Fällen nur gute Ergebnisse zu erzielen, wenn die vom Werk gelieferten Halterungen und Küvetten verwendet werden. Außerdem ist ein automatischer Abgleich erforderlich. So wurde in einem Vortrag der Firma Perkin-Elmer mitgeteilt (private Mitteilung), daß ohne diesen schwerlich reproduzierbare Spektren zu erwarten sind, insbesondere, wenn wie bei unseren FMIR-Zusätzen der Einfallswinkel des Lichtes nicht ablesbar ist.

Aus diesem Grunde war große manuelle Einfühlsamkeit in das Einstellen der Spiegel notwendig, um brauchbare Spektren zu erhalten. Diese konnte nur durch ständiges Probieren und äußerste Geduld erworben werden. So wurden die ersten Spektren erst nach stundenlangen Einstellungsversuchen aufgenommen. Dieses war insofern ungünstig, daß ein zu großer Zeitfaktor bei meinen Messungen hinzukam, der überdies auch noch sehr stark variierte. Hierdurch ergab sich für mich einerseits ein Nachteil dadurch, daß ich mit den biologischen Proben - solange sie noch als physiologisch zu betrachten waren - nur wenige Spektren aufnehmen konnte. Andererseits minderte die erheblich unterschiedliche Einstellungsdauer die Reproduzierbarkeit der Spektren.

Als zusätzliches Problem kamen zu Anfang Wasserdampfinkompensationen hinzu, die davon herrührten, daß etwas Wasserdampf aus den Küvetten austrat. Diese Schwierigkeit wirkte sich deswegen besonders gravierend aus, weil der in dem zur Verfügung stehenden IR-Gerät eingebaute TGS-Empfänger druckempfindlich war. Daher konnte während der Aufnahme der Spektren nicht gespült werden. Mangelnde Qualität der Spektren, die auf die Justierungsschwierigkeiten der Spiegel zurückzuführen war, wurde mithin durch die Inkompensationen noch weiter verschlechtert.

Nicht nur das Problem mit dem TGS-Element konnte besei-

tigt werden. Mit der Zeit erlangte ich ein optimales Geschick bei der Spiegelhandhabung. So sind die Spektren der vorliegenden Arbeit nach 5-20 Minuten Einstellung aufgenommen worden.*

2.3 Transmissionsküvette

2.3.1 Konstruktiver Aufbau

Aus in Kapitel 2.6.5.1 erläuterten Gründen nahm ich einige Spektren mittels der Transmissionstechnik auf. Hierzu verwendete ich eine Küvette, die von Zundel et al. (51,52) speziell zur Messung von Filmen und Membranen entwickelt und von Lindemann (53) für das Arbeiten mit flüchtigen Säuren und Basen verbessert wurde (Vgl. Abb. 10).

Diese Küvette mit Fenstern aus KRS-5 ist evakuierbar und erlaubt es, mittels konzentrierter Salzlösungen in verschließbaren Vorratsgefäßen eine definierte Luftfeuchtigkeit einzustellen. Durch eine im Vergleichsstrahl befindliche und analog konstruierte Küvette werden die Wasserdampfabsorptionen sowie die durch die Reflexion an den Küvettenfenstern bedingten Lichtverluste kompensiert.

2.3.2 Probenträger

Auch für die Transmissionsküvette wurde polykristallines Germanium als optisches Medium verwendet. Germanium ist zur Messung wässriger Lösungen gut geeignet und im Wellenzahlenbereich 4000-600 cm^{-1} nahezu ideal durchlässig.

Für die Probenträger ist es scheibenförmig zugeschnitten und mit einem Rahmen aus Quarzglas beklebt. Ein um die Scheiben fixierter Ring aus Edelstahl vergrößert die Fläche für den Rahmen und stabilisiert die Probenträger bei der Filmherstellung.

---

* Da die Spiegel für jede Messung neu justiert werden mußten und der Einfallswinkel des IR-Lichtes auf den Kristall nicht bestimmt werden konnte, waren nur qualitative Messungen möglich.

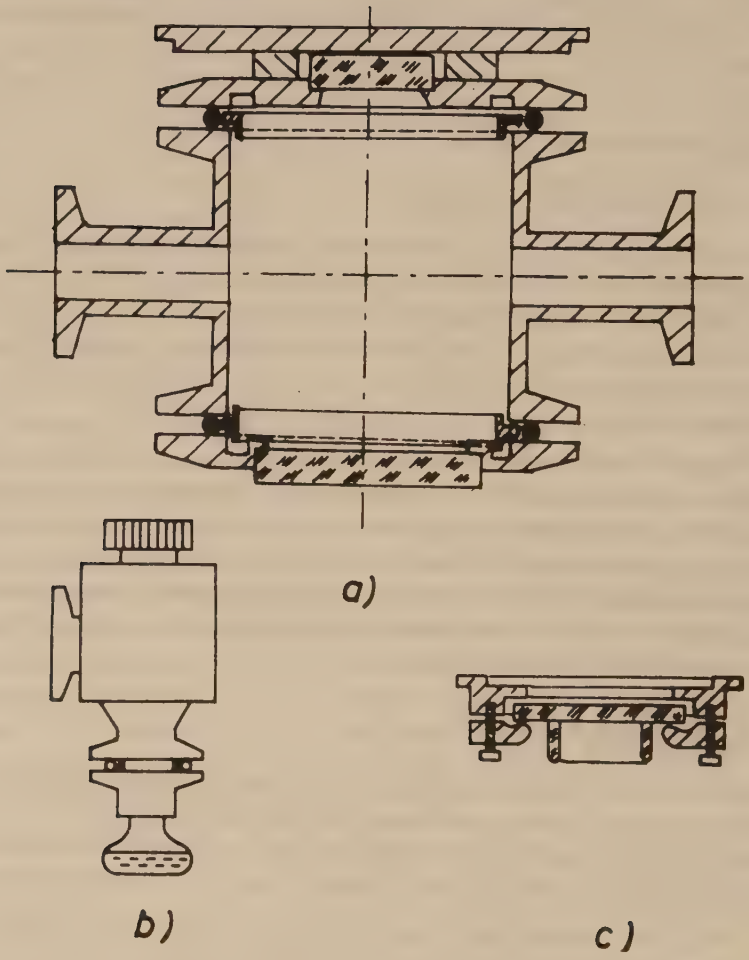


Abb. 10: Transmissionsküvette a) Kernstück und Fensterflansche, Flanschklammern weggelassen, b) Eckventil und Vorratsbehälter, verkleinert, c) Probenträger mit Halterung (Aus Lindemann (53) entnommen)

2.3.3 Filmherstellung

Die Filme wurden aus Membransuspensionen, die zwischen 5-16 mg Protein/ml enthielten, nach einem Verfahren von Hofmann und Zundel (54,55) in einer thermostatisierbaren Zentrifuge hergestellt. Die auf den Probenträger gebrachte Probenmenge sollte zwischen 100-300 µl betragen.

Zu Filmherstellung wurde der Probenträger, auf dessen Oberseite eine zylindrische Vertiefung mit dem Radius des Zentrifugenbechers eingeschliffen ist, auf ein Hg-Bad gelegt. Dieses befand sich in dem evakuierbaren Zentrifugenbehälter (Vgl. Abb. 11). Über dem Probenträger stand ein leichtes Gefäß mit gesättigter NaBr-Lösung. Nach dem Verschließen des Zentrifugenbechers wurde mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Dadurch befanden sich die Membransuspensionen in einer Atmosphäre von etwa 60% Luftfeuchtigkeit. Während der Zentrifugation* (10 h mit 1500 g bei 4° C) entzog die Salzlösung den Membranvesikeln das Wasser, ohne sie jedoch völlig zu trocknen. Die gleichzeitig vorhandene Zentrifugalkraft bewirkte, daß sich die Substanz zu einem gleichmäßigen Film auf dem Probenträger verteilte. Die Probenträger wurden anschließend in einer Stickstoffatmosphäre in die Küvette gebracht.

2.3.4 Vorbereitung für die Messung

Hierzu wurde mit Substanz- und Vergleichsküvette gleichermaßen vorgegangen. In die gegenüber dem Küvettenraum verschlossenen Salzvorratsgefäße füllte ich gesättigte $BaCl_2$-Lösung und evakuierte die Küvetten mit einer Wasserstrahlpumpe. Anschließend wurde das Ventil zwischen Vorratsgefäß und Innenraum geöffnet. Nach 24stündiger Thermostatisierung bei 25° C mußte dann nach Stokes et al. (56) 90% Luftfeuchtigkeit in dem Küvettenraum herrschten.

---

* Zentrifuge Typ D der Fa. A. Hettich, Tuttlingen

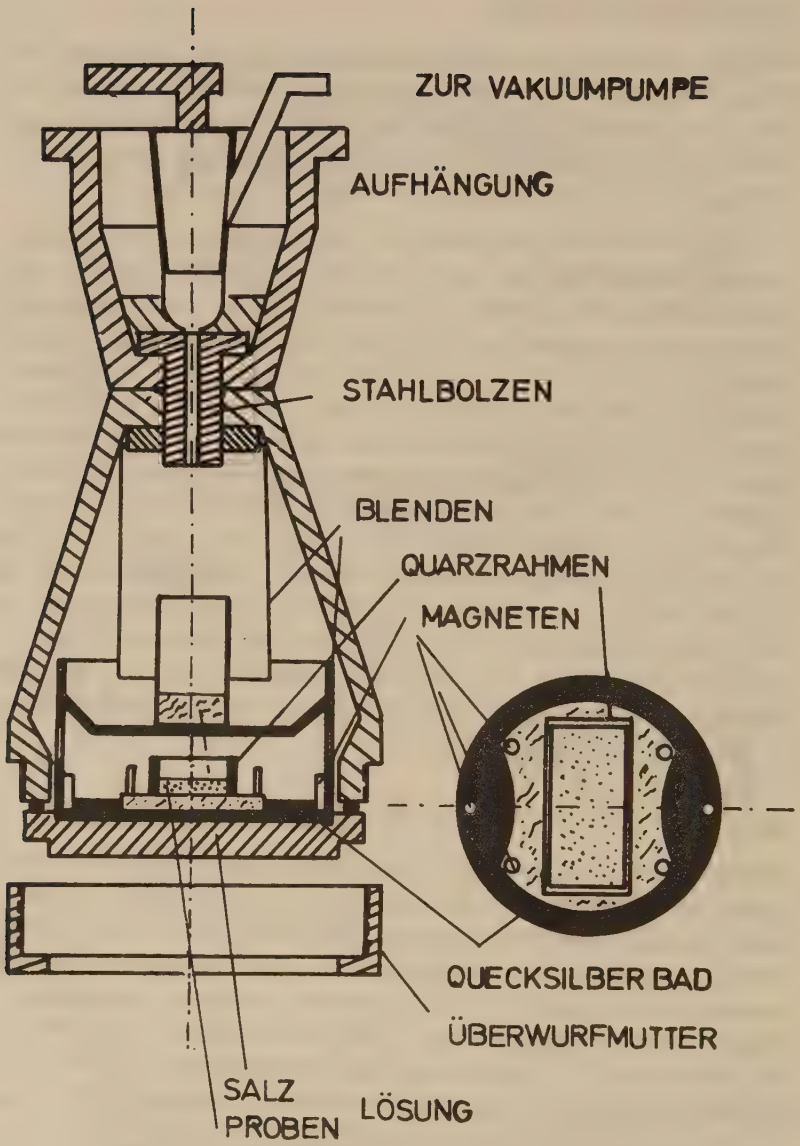


Abb. 11 Zentrifugenbehälter mit Hg-Bad (Aus Hofmann (55) entnommen)

2.4 Isolierung von Erythrozytenmembranen aus Rinderblut (57,44)

Die gesamte Aufarbeitung fand bei einer Temperatur von 4° C oder im Eisbad statt. Das Blut wurde frisch geschlachteten Rindern entnommen und sofort mit Na-Citrat-Lösung vermischt (9 Teile Blut mit einem Teil 3,8% Na-Citrat-Lösung). Durch Zentrifugation (1000 g, 30 min) konnte das Plasma als überstehende Flüssigkeit von den Zellen abgetrennt werden, die im 6-fachen Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9% NaCl) suspendiert und zentrifugiert wurde 2000 g, 30 min). Diesen Waschvorgang wiederholte ich dreimal.

Danach führte ich mit einem Na-Phosphat-Puffer - hergestellt aus 10 mM NaH_2PO_4, 7mM Na_2HPO_4, pH 7,4 - den osmotischen Schock durch. Hierzu wurde die Erythrozytensuspension schnell in das 10-fache Volumen des Puffers gegossen und 10 Minuten kräftig gerührt. Anschließend zentrifugierte ich das Hämolysat (30 000 g, 30 min), um die Erytrhozytenmembranen von der überstehenden Zellflüssigkeit abzutrennen.

Das Waschen der Membranen erfolgte, indem sie mit 5 Volumina eines Phosphat-Puffers - hergestellt aus 5 mM NaH_2PO_4, 3,5 mM Na_2HPO_4, 5 mM $MgCL_2$, pH 7,4, - gemischt, kurze Zeit gerührt und abzentrifugiert (30 000 g, 30 min) wurden. Dieser Vorgang mußte in der Regel viermal erfolgen.

Die auf diese Weise erhaltenen hämoglobinfreien Membranen werden im allgemeinen als Erythrozyten-ghosts bezeichnet.

2.5. Isolierung von Myelin aus dem Cerebralcortex des Schweines

Die Isolierung von Myelin aus dem Cerebralcortex des Schweines fand mittels subzellulärer Fraktionierung, welche in Abschnitt 2.6.3 ausführlich dargestellt wird, statt.

Hierzu wurde eine Methode von Cotman et al. (68), die der Isolierung von synaptischen Membranen aus Rattengesamthirn dient, modifiziert. Die Abwandlung der Präparationsmethode hätte den Zweck, während einer Aufarbeitung möglichst große Mengen Myelin zu isolieren. Daher wurde einerseits Schweinehirn, andererseits der Cerebralcortex - der sich durch einen hohen Myelingehalt auszeichnet - verwendet.

Für die Zentrifugation im Zonenrotor (2h, 27 000 rpm) wurde ein kontinuierlicher Dichtegradient von 15-50%iger Saccharoselösung verwendet. Nach Ende der Zentrifugation war die Konzentration des Myelins bei der 23%igen bzw. 0,73 molaren Saccharoselösung am höchsten (Vgl. Abschn. 2.6.4.1).

2.6 Präparation von Rattenhirn und Subfraktionierung

2.6.1 Allgemeines zur Subfraktionierung (114)

Eukaryotische Zellen enthalten zahlreiche intrazelluläre Membransysteme. Diese bilden eine Reihe von intrazellulären Kompartimenten, in denen die verschiedenen Stoffwechselvorgänge ablaufen. Um die Ultrastruktur der Membranen, Transportphänomene und Permeabilitätseigenschaften zu untersuchen, genügt es, intakte Zellen und Gewebe zu studieren. Sollen aber Kenntnisse über das molekulare Geschehen in einer Membran gewonnen werden, so bedarf es der Analyse ihrer chemischen Beschaffenheit. Hierzu muß ein bestimmtes Membransystem von den anderen Zellbestandteilen so abgetrennt werden, daß es in möglichst reiner Form vorliegt. Außerdem soll sich das isolierte Material substantiell nicht von der intakten Membran in situ unterscheiden.

Um bei einer Präparation sämtliche Membranbestandteile nebeneinander gewinnen und so den Anteil der jeweiligen Subfraktion im Zell- und auch Organaufbau abschätzen zu können, entwickelten Albert Claude und Mitarbeiter (1937-1945) die Grundlagen der subzellulären Fraktionierung.

Das Prinzip besteht darin, das Gewebe zunächst derart zu homogenisieren, daß zwar die Plasmamembranen in Bruchstücke zerfallen, Zellorganellen jedoch intakt bleiben. Aufgrund der unterschiedlichen Masse und Dichte der in dem heterogenen Homogenat enthaltenen Zellsubfraktionen können mittels einer Kombination von Differential- und Dichtegradientenzentrifugation die einzelnen Membransysteme isoliert werden.

2.6.2 Präparation von Rattenhirn bis zur Fraktion P_2 (Vgl. Abb. 12)

Die auf Whittaker (59) und Dekirmenjan et al. (60) zurückzuführende Präparation verlief folgendermaßen, wobei alle Schritte bei 4° C oder im Eisbad durchgeführt wurden:

1. Männliche Ratten im Alter von 5-8 Wochen*, die im Durchschnitt ein Gewicht von 135 g besaßen, wurden durch Schlag betäubt und dekapitiert. In der Regel wurden für die Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor 20 Tiere und für die im Zonenrotor 60 Tiere genommen. Die Gesamthirne (Durchschnittsgewicht ca. 1,45 g) wurden zu 10% Gewicht/Volumen bezogen auf das Feuchtgewicht in 0,32 M Saccharose eingewogen, mit dem Esge-Küchenstab zerkleinert und dann mit viermaliger Auf- und Abbewegung des Pistills bei 1500 upm homogenisiert (Homogenisator: Braun Melsungen). Der Abstand zwischen Glaswand und Pistill mußte 0,1 mm betragen.

2. Das Homogenat wurde in der Sorvall-Zentrifuge im GSA-Rotor zentrifugiert (900 g, 10 min).

3. Das die Kerne enthaltende Präzipitat wurde zu 20% (Gewicht/Volumen) des Feuchtgewichts in 0,32 M Saccharose aufgenommen, erneut homogenisiert und, wie unter Punkt 2 beschrieben, zentrifugiert.

4. Die vereinten Überstände $Ü_1$ und $Ü_1'$ der beiden Zentrifugationen wurden nun 20 Minuten bei 11 500 g zentrifugiert, um die "rohe Mitochondrienfraktion" P_2 zu erhalten. Der die Mikrosomen und cytoplasmatischen Fraktionen enthaltende Überstand war für meine Zwecke nicht weiter verwendbar. Dagegen interessierten mich die verschiedenen im Präzipitat P_2 vorliegenden Membrantypen, die durch

---

* Tiere dieses Alters besitzen ein noch wenig myelinisiertes Gehirn.

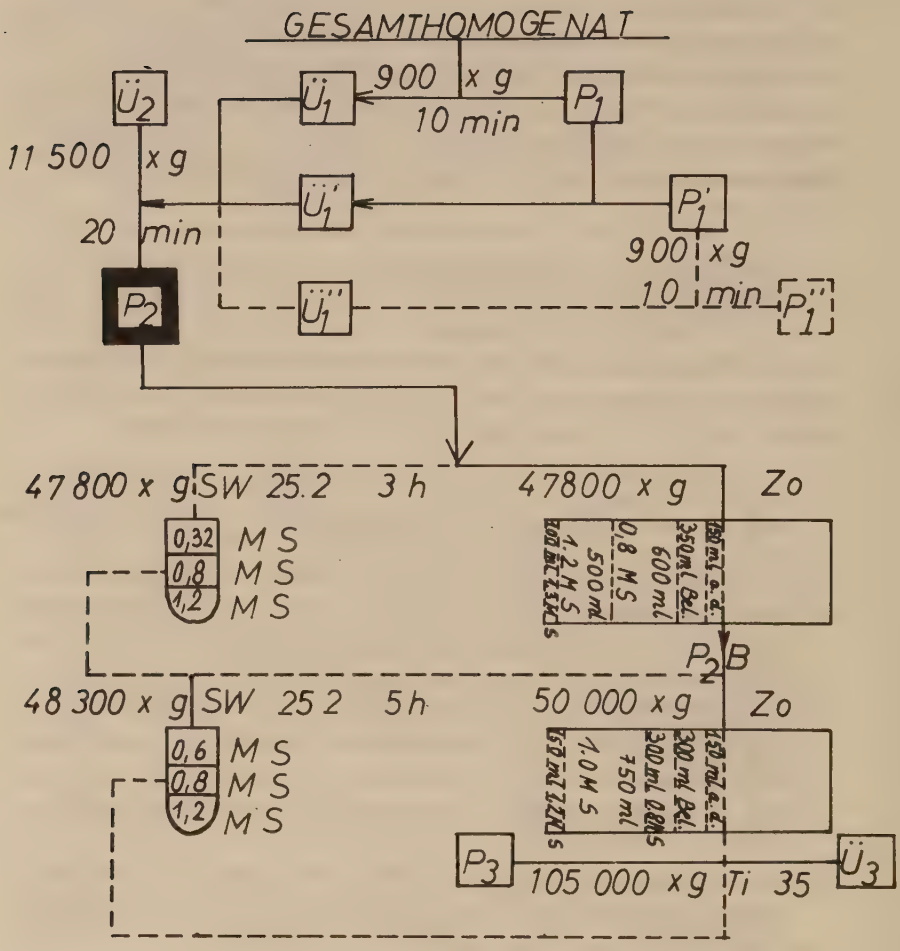


Abb. 12: Schema zur Isolierung verschiedener Membranfraktionen aus Rattengesamtgehirn mittels Zentrifugation.

Abkürzungen: P = Präzipitat, Ü = Überstand, S = Saccharose P_1 = Zellkern-Fraktion, $Ü_1$ = Gesamthomogenat ohne Zellkernfraktion, $Ü_2$ = Mikrosomen, P_2 = rohe Mitochondrienfraktion, P_2B = Synaptosomenfraktion, Zo = Zonenrotor, SW 25.2 = Ausschwingrotor. (Alle Zentrifugationsschritte bis zu P_2 erfolgten im GSA-Rotor der Sorvall-Zentrifuge)

Dichtegradientenzentrifugationen aufgetrennt werden konnten.

2.6.3 Subfraktionierung von Fraktion P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation

2.6.3.1 Allgemeines zur Dichtegradientenzentrifugation

Zur Subfraktionierung von Zellpartikeln ist die Dichtegradientenzentrifugation besonders gut geeignet. Dabei wird eine Suspension oder Lösung von Teilchen verschiedener Größe oder Dichte gegen einen meist aus Saccharose- oder Cäsiumchlorid-Lösung aufgebauten kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Gradienten zunehmender Dichte zentrifugiert. Während der Zentrifugation wandern die Partikel solange durch die verschiedenen Zonen des Gradienten, bis ihre Dichte der des Lösungsmittels entspricht und die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel $\frac{dx}{dt}$ in der Beziehung

$$\frac{dx}{dt} = \frac{D}{kT} m_i \omega^2 x \, (1 - \varrho_l/\varrho_i)$$

D = Diffusionskonstante
T = absolute Temperatur
k = Boltzmann-Konstante
ω = Winkelgeschwindigkeit
$\frac{dx}{dt}$ = Wanderungsgeschwindigkeit
ϱ_l/ϱ_i = Dichte des Lösungsmittels/Dichte der Teilchen
m_i = Masse der Teilchen

Null wird.

Die Dichtezusammensetzung des Gradienten, desgleichen auch die Zahl der Dichtegradientenzentrifugationen hängen von den zu trennenden Partikeln ab.

Zur Fraktionierung größerer Substanzmengen verwendet man heute meistens Zonenrotoren statt Ausschwingrotoren, denn in großen Zonenrotoren ist häufig das gesamte Material mittels eines einzigen Laufes in die Subfraktionen zerlegbar (62,63).

So kann man in der präparativen Ultrazentrifuge Spinco L (Beckman) für die Subfraktionierung der rohen Mitochondrienfraktion P_2 (59-60) sowohl den Ti 15 Zonen- als auch SW 25.2 Ausschwing-Rotor benützen. Im Zonenrotor jedoch ist dreimal soviel Substanz wie im Ausschwingrotor auftrennbar.

2.6.3.2 Subfraktionen nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation

Die Subfraktionierung der "rohen Mitochondrienfraktion" P_2 erfolgte bei Whittaker (59), Dekirmenjan et al. (60) und Lemkey-Johnston et al.(61) mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor. Durch geeignete Laufzeiten und Umdrehungszahlen wurden die in Tab. 1 zu ersehenden Subfraktionen gewonnen und biochemisch sowie morphologisch charakterisiert (59).

Subfraktionen	Subzelluläre Zusammensetzung Hauptanteile nach Whittaker	Saccharosemolarität der Gradientenschicht
P_2A	Myelin	0,32-0,8
P_2B	Synaptosomen	0,8 -1,2
P_2C	Mitochondrien	Präzipitat

Tab. 1: Bezeichnung der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Subfraktionen nach Whittaker (59) und Angabe der hauptsächlich darin enthaltenen Membrananteile sowie die dazu gehörende Dichte der Saccharoseschicht.

Whittaker charakterisierte hierbei P_2B als Synaptosomen-Fraktion. Sie enthält jedoch, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, auch sehr viele Axonsegmente als weitere Bestandteile.

2.6.3.3 Subfraktionen nach der zweiten Dichtegradientenzentrifugation

Zur besseren Trennung und zur Erleichterung der Identifizierung der in P_2B enthaltenen Membranfragmente führten Dekirmenjan et al. sowie Lemkey-Johnston et al. eine zweite Dichtegradientenzentrifugation durch (Vgl. S. 45).

Durch morphologische und enzymatische Untersuchungen der Partikel, die zwischen die einzelnen Schichten sedimentierten, gelang es diesen Autoren, die Membranbestandteile von P_2B weitgehend zu identifizieren.

Lemkey-Johnston et al (61) schreiben hierzu:

"In summary, the the P_2B fraction generally considered as a "synaptosome" fraction can be subfractionated into layers which contain several types of particles in definitely graded proportions. The two lighter layers, a and b, are abundantly enriched in axonal segments with notable amounts of membranous fragments of undetermined origin occuring as well. The denser layers, c, d, and e, have the highest concentration of synaptosomes with only e containing significant numbers of free mitochondria. While it can be said that layers a and b have almost no synaptosomes, the heavier layers, c, d and e contain substantial numbers of them, some of which are attached to axons. Segments of unmyelinated axons occured in all P_2B subfractions."

Wie diesem Text zu entnehmen ist, wurde P_2B in die fünf Subfraktionen a-e unterteilt. Diesen Subfraktionen entsprechen die verschiedenen Dichtebereiche des Gradienten.

Im folgenden sind anhand der Ergebnisse von Lemkey-Johnston und Dekirmenjan die zu den Subfraktionen von P_2B gehörenden Membranbestandteile sowie Saccharosemolaritäten der Schichten des Gradienten, zwischen denen die verschiedenen subzellulären Komponenten anzufinden sind, in Tabelle 2 zusammengestellt.

Bezüglich der Häufigkeit dieser subzelluläre Komponenten von P_2B gibt Lemkey-Johnston folgende Reihenfolge an: Axonale Segmente > Synaptosomen > Membranen unbekannter Herkunft.

2.6.3.4 Vorteile der zweiten Dichtegradientenzentrifugation

Die zweite Dichtegradientenzentrifugation diente bei Dekirmenjan und Lemkey-Johnston im wesentlichen dazu, die Fraktion P_2B durch den vielschichtigen Aufbau des Gradienten im Bereich von 0,8-1,2 M Saccharose möglichst rein in die

Subfraktionen	Membrankomponenten (nach Elektronenmikroskopie)	Saccharosemolarität des Gradientenbereichs
P_2B_a	Myelinfragmente; membranöse Elemente unbekannter Herkunft; viele axonale Segmente	0,32-0,9
P_2B_b	Elemente unbekannter Herkunft; viele axonale Segmente; kaum Synapsenmembranen	0,9-1,0
P_2B_c	Großer Anteil von Synaptosomen mit eingeschlossenen Mitochondrien; etliche axonale Segmente (viel weniger als in der Fraktion P_2B_b)	1,0-1,1
P_2B_d	Großer Anteil von Synaptosomen mit eingeschlossenen Mitochondrien; etliche axonale Segmente (weniger als in der Fraktion P_2B_c); wenige freie Mitochondrien	1,1-1,2
P_2B_e	Sehr großer Anteil von Synaptosomen; die meisten freien Mitochondrien; auch wenige axonale Segmente	Präzipitat

Tab. 2: Anhand der Literatur (61,60) durchgeführte Zusammenstellung der zu den Subfraktionen von P_2B gehörenden Membranbestandteile sowie Saccharosemolaritäten der Schichten des Gradienten, zwischen denen die verschiedenen Partikel zu finden sind.

darin enthaltenen Komponenten aufzuspalten und diese zu charakterisieren.

Die Membranfragmente sind auch bereits nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation in dem Gradientenbereich anzutreffen, der ihrer Dichte entspricht. Jedoch ist es hier wegen der ohnehin schon eng aneinanderliegenden, ja überlappenden Bereiche sehr viel besser, nicht von einer Axonsegment-Fraktion zu sprechen, sondern von der Fraktion, die zwischen den Schichten von 0,9-1,0 M Saccharose liegt.

Eine Charakterisierung verschiedener Membranpartikel kann somit schon nach dem ersten Zentrifugationslauf erfolgen, wenn diese Fraktion nicht, wie es laborüblich ist, als Gesamtheit entnommen wird. Vielmehr muß die Entnahme stufenweise von niedrigeren zu höheren Saccharosekonzentrationen erfolgen. Die Abb. 13 zeigt, daß der gesamte Gra-

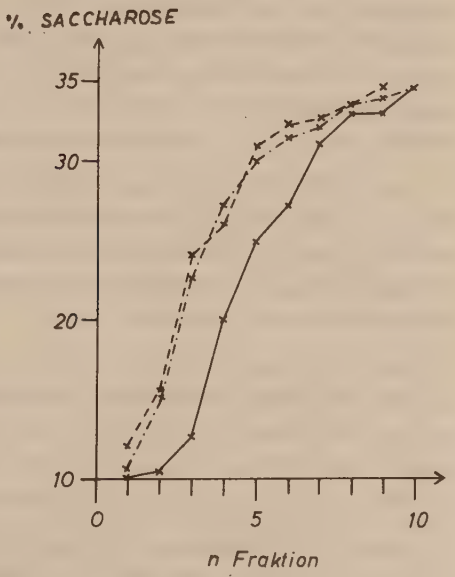


Abb. 13: Verlauf des Dichtegradienten nach der Zentrifugation im Ausschwingrotor. Die Entnahme der Lösungen fand stufenweise von niedrigeren zu höheren Saccharosekonzentrationen statt. Abk.: n= Nummer der Fraktion, deren Saccharosekonzentration bestimmt wurde. ——, – – –, – · – · – = Gradientenverlauf in den drei sich in einem Rotor befindlichen Zentrifugenröhrchen.

dient, der nach der ersten Zentrifugation auf diese Weise entnommen wurde, einen angenähert linearen Verlauf besitzt. Die hohe Steigung besagt, daß nur sehr kleine Fraktionen einen relativ guten Reinheitsgrad bezüglich einer einzigen Membransorte besitzen können.

Um größere und reinere Mengen von Membranfragmenten aus der Fraktion P_2 zu gewinnen, bot sich die Zentrifugation im Zonenrotor an (62,64). In den Abbildungen 14 a und b sind die Protein- sowie Saccharoseverteilungskurven nach solchen Zentrifugationen dargestellt.

2.6.3.5 Subfraktionierung von P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor

Als Beladung für den Ti-15 Rotor wurden 300 ml Membransuspension verwendet, die aus durchschnittlich 87 g Rattenhirn stammten und im Mittel 13,3 g Protein enthielten. Das Einfüllen des Gradienten und der Beladung sowie die Überschichtung mit 150 ml aqua dest. erfolgten stets bei einer Pumpgeschwindigkeit von 28 ml/min und einer Rotorumdrehungszahl von 2500 upm. Für den diskontinuierlichen Gradienten (Vgl. Abb. 14 b, S. 35) wurden nacheinander 600 ml einer 0,8 M, 500 ml einer 1,2 M und 550 ml einer 1,3 M Saccharoselösung eingefüllt.

Den kontinuierlichen Gradienten (Vgl. Abb. 14 b), den ich bei einigen Präparationen verwendete, stellte ich aus 0,32 und 1,3 M Saccharoselösung her. Die Mischung der beiden Lösungen erfolgte durch den automatischen Gradientenmischer (Beckman).

Zum Auspumpen des Gradienten bei nun wiederum 2500 upm wurde eine Saccharoselösung verwendet, deren Konzentration um ca. 5% höher als die der dichtesten Zuckerlösung im Rotor sein mußte, also 42 bzw. 44 Prozent für den kontinuierlichen bzw. diskontinuierlichen Gradienten.

Die hinausgepumpte Flüssigkeit wurde in 30 ml Fraktionen gesammelt. Mit diesen wurde analog verfahren wie mit den Fraktionen, die ich nach der Dichtegradienten-

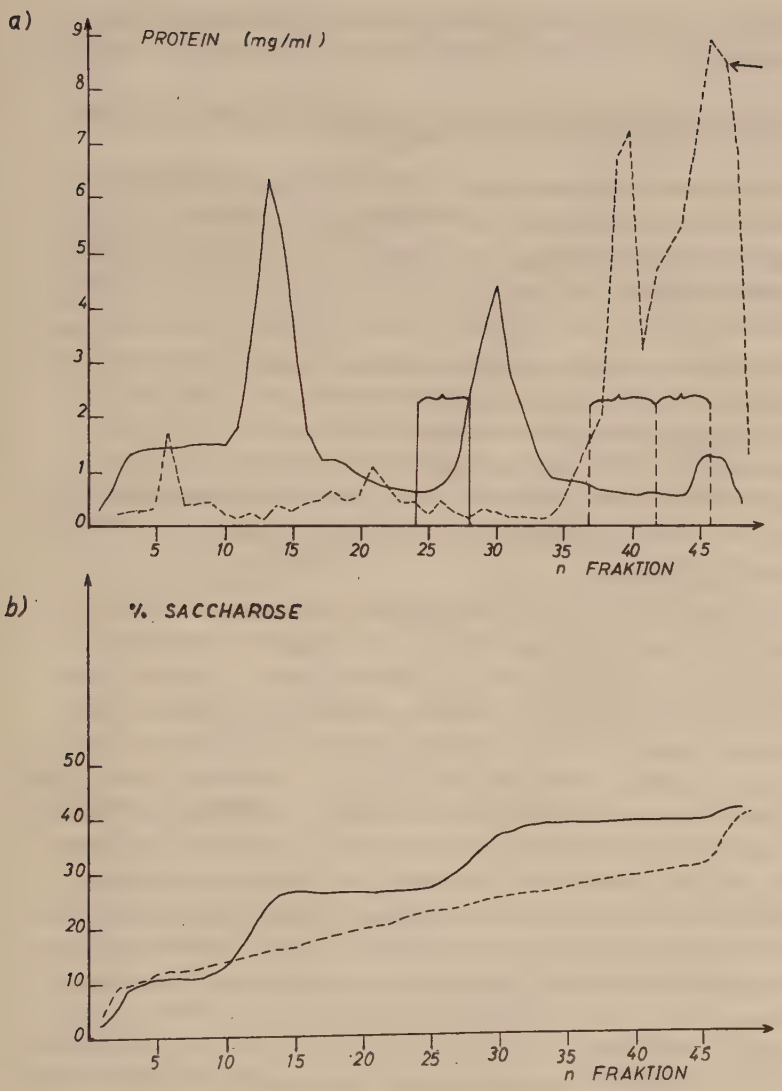


Abb. 14a,b: Dichte und Proteingehalt der Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugationen im Zonenrotor. Zeichenerklärung: —— diskontinuierlich, --- kontinuierlich, senkrechte Striche: Diese Fraktionen wurden vereint.
Abb. 14a: Proteingehalt der Fraktionen in mg/ml.
Abb. 14b: Saccharosegehalt der Fraktionen in Gewichtsprozenten. Die Beladung für die Rotoren betrug in g Protein: diskontinuierlich: 8,6; kontinuierlich: 10,5

zentrifugation im Auschwingrotor aus den Zentrifugenröhrchen entnahm.

2.6.3.6 Subfraktionierung von P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor

Für die Subfraktionierung der Fraktion P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor verwendete ich 0,8 und 1,2 M Saccharose. In die zum 25.2. Rotor passenden Zentrifugenröhrchen füllte ich zunächst 10 ml der dünneren und unterschichtete mit 30 ml der dichteren Lösung.

Diese Unterschichtung hat den Vorteil, daß turbulente Strömungen besser vermieden werden können, als es beim sukzessiv erfolgenden Aufeinanderschichten der Fall ist. Auf den derart präparierten diskontinuierlichen Gradienten gab ich 20 Milliliter von der "rohen Mitochondrienfraktion" P_2. Die Dichte der Suspension entsprach derjenigen einer 0,32 M Saccharoselösung.

Darauf wurde unter den Bedingungen, wie sie der Tabelle 12 (Seite 28) zu entnehmen sind, zentrifugiert. Mittels einer Spritze, die mit einer U-förmigen Nadel versehen war, wurden nach der Zentrifugation die Röhrchen entleert. Die Entleerung erfolgte von oben nach unten, also von geringerer zu höherer Dichte. Dabei entnahm ich die zuoberst befindliche helle Zone, die vor allem Myelin (59-61) enthält, als Gesamtfraktion. Dann erfolgten Entnahmen von je 2-3 Millilitern, bis die nächste Zone erreicht war. Sie zeigte durch ihre starke Trübung das Vorhandensein membranöser Strukturen an. Hier fraktionierte ich vorsichtig in Einmilliliterportionen. Wie in Abschnitt 2.6.3.4 erläutert ist, sind bei der Fraktionierung steil verlaufender Gradienten kleine Mengen zu entnehmen, wenn die Reinheit des Materials optimal sein soll. Die verbleibende Flüssigkeit wurde wiederum in 2 bis 3 Schritten entnommen. Insgesamt erhielt ich auf diese Weise 8-10 Fraktionen (Vgl. Abb. 13, Seite 34).

Die Auswahl des Materials, mit dem ich weiter arbeitete, fand anhand der ermittelten Zuckerkonzentrationen statt. Bei

den durch Zentrifugation im Zonenrotor gewonnenen Fraktionen erfolgte zusätzlich die Bestimmung des Proteingehaltes.

2.6.4 Charakterisierung der Dichtegradientenfraktionen

2.6.4.1 Bestimmung der Saccharosemolarität

Die Saccharosekonzentration jeder Fraktion wurde mit Hilfe eines Refraktometers bei einer Temperatur von 20° C bestimmt. Die Werte des Zuckergehaltes in Gewichtsprozenten waren direkt ablesbar. Über die dazugehörigen Dichten, die ich einer Tabelle (39) entnahm, berechnete ich mittels der Formeln

$$V = \frac{m}{\varrho} \; ; \; m = V \times \varrho$$

$$\frac{m}{M} = n_V$$

$$n_{1000} = \frac{n_V}{V} \times 1000$$

V = Volumen einer Lösung von der Masse 1000 g

ϱ = Dichte in g/cm^3 bei 20° C

m = Masse in g

M = Molekulargewicht

n_V = Zahl der Teilchen in dem Volumen V

n_{1000} = Zahl der Teilchen in 1000 cm^3

die Saccharosemolaritäten der Lösungen.

In der Tabelle 3 stellte ich die Werte der Konzentrationen und der entsprechenden Molaritäten, die bei der Auswahl der Fraktionen (Vgl. Abschn. 2.6.5.2) und beim Anmachen der für die Dichtegradientenzentrifugationen benötigten Saccharoselösungen von Bedeutung waren, zusammen.

Molarität der Saccharoselösung in Mol/liter	Konzentration in Gewichtsprozenten
0,32	10,5
0,7	22,0
0,8	24,6
0,9	27,6
1,0	30,7
1,1	32,5
1,2	35,5
1,3	37,8

Tab. 3: Zusammenstellung der zusammengehörigen Werte der Saccharosekonzentrationen und Saccharosemolaritäten.

2.6.4.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes griff ich auf die Methode mit SDS zurück, mittels derer man die Proteinbestimmung schnell und unkompliziert durchführen kann.

SDS ist ein Detergens mit hoher Affinität zu Proteinen und trennt die Proteine als lösliche SDS-Komplexe vollständig aus der Membran. Die Proteinbestimmung der mit SDS behandelten Lösungen erfolgt dann bei 280 mμ. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die im Eiweiß gebundenen aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin).

Für meine Messungen verwendete ich eine 20 %ige SDS-Lösung. Zu 500 μl Probe gab ich 50 μl der Detergenslösung. War die zu untersuchende Substanz zu konzentriert, so verdünnte ich im vornherein mit aqua dest.. Als Standard dienten 500 μl einer Lösung von 700 μg Rinderalbumin/ml. Zu diesen wurden 50 μl der SDS-Lösung gegeben. Nach gutem Vermischen der Inkubationsansätze, die bei Zimmertemperatur stehen bleiben konnten, erfolgte die Messung nach einer halben Stunde im Zeiss-Photometer.

2.6.5 Zur Auswahl der Dichtegradientenfraktionen für den weiteren Präparationsverlauf

2.6.5.1 Problematik bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, dienten IR-Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Zundel mit Membranpräparaten aus Rattenhirn durchgeführt wurden, als Ausgangspunkt dieser Arbeit. Diese Membranen waren mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor präpariert und mittels der Transmissionstechnik gemessen worden.

Die Ergebnisse beinhalten, daß es sich um die Axonmembranen handeln soll, deren Proteine eine kaliuminduzierte ß-Konformation aufweisen. Laut Dekirmenjan et al.(60) und Lemkey-Johnston (61) befinden sich diese Membranbestandteile im Bereich von 0,9-1,0 molarer Saccharose im Verhältnis zu anderen Membranpartikeln in der höchsten Kon-

zentration.

Bei meinen Messungen mit der FMIR-Küvette wollte ich die Reproduzierbarkeit und die Reversibilität der Konformationsumwandlung überprüfen. Wegen des großen Substanzbedarfs bei Messungen in der FMIR-Küvette führte ich die Dichtegradientenzentrifugationen im Zonenrotor durch. Hiernach werden stets Dichte und Proteingehalt jeder Fraktion bestimmt (Vgl. 2.6.3.6). Anhand der Literaturwerte können genauere Angaben darüber gemacht werden, welche Membranbestandteile die ausgewählten Fraktionen enthalten.

Nach der Zentrifugation im Ausschwingrotor wird dagegen auf Erfahrungswerte zurückgreifend nur noch visuell festgestellt, zwischen welchen Saccharoseschichten sich die Membranpartikel befinden und dementsprechend einklassifiziert. So wurden auch die Membranen, die sich nach der zweiten Dichtegradientenzentrifugation im Bereich zwischen 0,8-1,0 molarer Saccharose ansammelten, von Papakostidis pauschal als Axonmembranen bezeichnet.

In Unkenntnis dieser Pauschalisierung verwendete ich für die Messungen meiner ersten Versuche, bei denen das Untersuchungsmaterial noch durch zwei Dichtegradientenzentrifugationen gewonnen wurde, nur die Membranbestandteile des Dichtebereichs, in dem die Axonmembranen gehäuft auftreten. Eine durch Kalium induzierte ß-Konformation der Proteine ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Es lag hier zunächst nahe, den Grund in der für das FMIR-verfahren abgewandelten Ionenbeladung der Membranen zu suchen. Bei den deswegen durchgeführten Transmissionsmessungen war jedoch ebenfalls keine Zunahme von ß-strukturierten Proteinen bei gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen nachweisbar.

Die Ursache konnte hiermit bei den Präparationsbedingungen liegen. Insbesondere konnte die längere Zeitdauer, die für zwei Subfraktionierungen im Zonenrotor benötigt wurden, eine Rolle spielen. Während zwei Zentrifugationsläufe im Aus-

schwingrotor an einem Tag durchgeführt werden konnten, wurden für zwei Läufe im Zonenrotor zwei Tage benötigt.

Außerdem bestand die Möglichkeit, daß die Membranen mit der durch Kalium induzierbaren Konformationsumwandlung in einem anderen Gradientenbereich als dem von 0,9-1,0 M Saccharose sedimentierten. Daher führte ich die nächsten Membranpräparationen im Ausschwingrotor durch. Bereits der erste Gradient wurde, wie in Abschnitt 2.6.3.6 beschrieben, fraktioniert, und die Membranen verschiedener Dichtebereiche wurden mittels der Transmissionstechnik in Gegenwart von Kaliumionen untersucht. Wegen mangelnder Substanz waren nach diesen Aufarbeitungen keine Messungen mit der FMIR-Küvette durchführbar.

Es zeigte sich, daß die Membrananteile im Dichtebereich über 1,0 M Saccharose mehr Proteine in ß-Konformation als die Membranen der anderen Gradientenbereiche besitzen. Hierauf untersuchte ich die nach einer Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor erhaltenen Fraktionen verschiedener Dichtebereiche. Ich führte Messungen sowohl mit der FMIR- als auch Transmissions-Küvette durch. Beide Meßverfahren wurden angewendet, um eventuell verfahrensbedingte Veränderungen der Membranen zu erkennen. Die Zusammenstellung der von mir durchgeführten Präparationen im Vergleich zu Dekirmenjan und Papakostidis ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

2.6.5.2 In der vorliegenden Arbeit verwendete Fraktionen

Die Auswahl der nach den Dichtegradientenzentrifugationen für die IR-spektroskopischen Untersuchungen verwendeten Fraktionen erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Dekirmenjan (60) und Lemkey-Johnston (61) (Siehe Tab. 2, S. 32).

Die Fraktionen im interessierenden Dichtebereich wurden zusammengeschüttet und weiteren Präparationsschritten unterworfen. Diese hingen davon ab, wieviel Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt, welches Meßverfahren angewendet und welche Membranfraktion untersucht wurden.

Tab. 4: Zusammenstellung der Präparationsweisen bei der Subfraktionierung von der aus Rattenhirn gewonnenen "rohen Mitochondrienfraktion" P_2, bei Dekirmenjan (60), Papakostidis (44) und der Autorin der vorliegenden Arbeit.

Erläuterungen [a]) Dekirmenjan erwähnt in seiner Arbeit, daß die Präparation in Anlehnung an Whittaker (59) erfolgte. Er macht keine Angaben dazu , welches Volumen der bei der ersten Dichtegradientenzentrifugation verwendete Gradient besaß. Aus diesem Grunde sind die von Whittaker verwendeten Volumina angegeben. Nachdem Dekirmenjan bei der zweiten Dichtegradientenzentrifugation den SW 25.1 Rotor verwendete, darf angenommen werden, daß er auch die erste Dichtegradientenzentrifugation mit diesem Rotor durchführte (Die zu diesem Rotor gehörigen Zentrifugenröhrchen können mit 40 Milliliter gefüllt werden.). [b]) Papakostidis verweist bei seiner Arbeit auf die Publikation von Lemkey-Johnston (61). Lemkey-Johnston bezieht sich wiederum auf Dekirmenjan, der, wie bereits erwähnt, keine Mengenangaben gemacht hat. Daher wurde bei der Beschreibung des Präparationsablaufs, den Papakostidis durchführte, auf eine Mengenangabe verzichtet. [c]) Es wurden auch die Membranen des Präzipitates untersucht. [d]) Ob eine weitere Zentrifugation in der Ultrazentrifuge durchgeführt wurde, hing von den beabsichtigten Untersuchungen ab. [e,f]) Wenn ein Teil der Substanz osmotisch geschockt wurde, so war eine anschließende Zentrifugation notwendig (100 000 g/ 1 h).

Zeichenerklärung: Ja = +, Nein = -, kein Zeichen, wenn ein weiterer Präparationsschritt entfallen ist.

Abkürzungen: A = Ausschwingrotor, Zo = Zonenrotor, M S = Molarität der Saccharoselösung, gra.- = Gradient, diskon. = diskontinuierlich

Schematischer Verlauf der Präparation	Autoren	(60)	(44)	Autorin der vorliegenden Arbeit		
	Unterschiede					
1. P_2	Rotor	A	A	A	Zo	Zo
1. Dichtegra.-zentrifugation (Dauer 3 h)	Gradient a) diskon. ml/ M S	[a]	[b]			
		2/0,8 2/1,2		30/1,2 10/0,8	100/1,3 500/1,2 600/0,8 0,8-1,3	100/1,3 500/1,2 600/0,8
	b) kon. M S					
	Beladung: ml	1		20	300	300
2. Subfraktionen	M S	0,8-1,2	0,8-1,2	[c] 0,8-0,9 1,0-1,1 1,1	0,8-1,0 1,0-1,1	0,9-1,06
3. Verdünnung	Resultierende M S	0,32	0,6	0,32	0,32	0,6
4. Zentrifugation (100 00 g/90 min)	durchgeführt?	+	-	-	+	-
5. Resuspendierung des Präzipitates in 0,32 M S	durchgeführt?	+	-	-	-	-
6. 2. Dichtegra.-zentrifugation	Rotor	A	A			Zo

	Gradient ml/ M S	?/0,9 ?/1,0 ?/1,1 ?/1,2	10/0,8 30/1,1			150/1,2 750/1,0 300/0,8
	Beladung: ml	?	30			300/0,8
	Dauer in h	6	5			5
7. Subfraktionen	M S	0,32-1,2	0,8-1,0			0,9-1,0
8. Zentrifugation	durchgeführt?	[d]	+			+
9. Osmotischer Schock	durchgeführt?		+		[e]	+
10. Zentrifugation	durchgeführt?		+		[f]	+
11. Charakterisierung der Membranen	FMIR Transmission	- -	- +	- +	+ +	+ +

Tab. 4: Legende siehe S. 41

In den ersten von mir durchgeführten Versuchsreihen vereinte ich nach dem ersten Zonenrotorlauf die Fraktionen im Bereich von 0,9-1,06 M Saccharose, gab diese auf einen zweiten Dichtegradienten im Zonenrotor und verwendete danach nur die Fraktionen im Bereich von 0,9-1,0 M Saccharose. Die Charakterisierung der darin enthaltenen membranösen Bestandteile erfolgte mittels Versuchsserien, die in der FMIR-Küvette durchgeführt wurden.

Aus Gründen, die im Abschnitt 2.6.5.1 erläutert sind, benutzte ich für die folgenden Präparationen den Ausschwingrotor, verzichtete jedoch auf die zweite Dichtegradientenzentrifugation. Für die in der Transmissionsküvette durchgeführten Messungen wurden Fraktionen folgender Gradientenbereiche verwendet:

Molarität der Saccharoselösung in Mol/Liter	% Saccharose
0,8-0,9	24,6-27,6
1,0-1,1	30,7-32,5
>1,1	>32,5

Desgleichen erfolgte auch eine Charakterisierung der sich im Präzipitat befindlichen membranösen Strukturen, von denen ein großer Anteil freie Mitochondrien sind. Bei weiteren Versuchsserien sollten von demselben Membranpräparat sowohl FMIR- als auch Transmissionsmessungen durchgeführt werden. Nach der im Zonenrotor stattgefundenen Subfraktionierung wurden die Fraktionen der Dichtebereiche

Molarität der Saccharoselösung in Mol/Liter	% Saccharose
0,9-1,0	27,6-30,7
1,0-1,1	30,7-32,5
1,1-1,2	32,5-35,5
>1,2	>35,5

zusammengeschüttet und weiter behandelt, wie es im Abschnitt 2.6.6 erläutert wird.

2.6.6 Weiterer Präparationsverlauf mit den ausgewählten Fraktionen

2.6.6.1 Bei der Durchführung einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor

Hierzu wurde das 0,9 M Saccharose enthaltende Gemisch der Fraktionen mit dem gleichen Volumen einer 0,3 M Saccharoselösung auf 0,6 M Saccharose gebracht. 300 Milliliter dieser Membransuspension dienten als Beladung für den Zonenrotor.

Die Bedingungen für das Einfüllen des Gradienten, der Beladung und der 150 ml destillierten Wassers sind Abschn. 2.6.3.5 zu entnehmen. Für den Gradienten wurden 150 ml 1,2 M, 750 ml 1,0 M und 300 ml 0,8 M Saccharose verwendet (Vgl. Abb. 10). Nach fünfstündiger Zentrifugation wurde der Gradient (Vgl. Abschn. 2.6.3.5) ausgepumpt und die Fraktionen im Bereich von 0,9-1,0 M Saccharose weiter verwendet. Mit ihnen wurde so verfahren, wie es im folgenden Abschnitt geschildert wird.

2.6.6.2 Nach abgeschlossener Subfraktionierung

Die weitere Präparation der Membransuspensionen nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation, mit denen keine weitere Subfraktionierung durchgeführt, und derjenigen, die nach dem zweiten Lauf zwecks weiterer Bearbeitung ausgewählt wurden, verlief analog. Desgleichen wurde auch kein Unterschied bezüglich des Typs der durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation gemacht.

Lediglich das Präzipitat, welches nach der Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor vorlag, bedurfte keines weiteren Präparationsschrittes mehr.

Die Membransuspensionen wurden mit der doppelten Menge aqua dest. auf 0,3 M Saccharose gebracht. Die Zugabe des eisgekühlten destillierten Wassers zur im Eisbad gerührten

Membransuspension erfolgte tropfenweise, um einen partiellen osmotischen Schock zu vermeiden. Anschließend wurde in der Beckman L 3-50 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Bei nur wenig Membransuspension wurde der Ti-50-Ausschwingrotor (42 000 upm, 75 min), bei größeren Substanzmengen der Ti-35 Rotor 32 000 upm, 2 h) verwendet.

Entweder konnten die sich im Präzipitat befindlichen Membranfragmente bereits jetzt für die Dialyse und somit für die IR-Messungen vorbereitet werden, oder sie wurden zuvor osmotisch geschockt. Bei einigen Aufarbeitungen teilte ich hierfür die Substanzmenge. Ein Teil blieb unbehandelt, mit dem anderen wurde ein osmotischer Schock durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob und welchen Einfluß eine Lysis auf den Verlauf der Spektren hat.

Für den osmotischen Schock wurde das Präzipitat im 20-fachen Volumen aqua dest. aufgenommen, homogenisiert und mindestens eine halbe Stunde stehengelassen. Danach wurde im Ti-35-Rotor (32 000 upm, 2 h) sedimentiert.

2.6.6.3 Vorbereitung für die Dialyse

Nach den Zentrifugationen in der Ultrazentrifuge wurden die Membranfraktionen entweder in der FMIR-Küvette oder für Transmissionsmessungen in Dialysierschläuchen dialysiert.

Für Messungen in der FMIR-Küvette konnten die Membranen ohne weitere Behandlung verwendet werden, da sie die benötigte pastenarte Beschaffenheit besaßen.

Ansonsten wurden sie im gleichen Volumen destillierten Wassers oder in 0,32 molarer Saccharoselösung aufgenommen, homogenisiert und dann in die Dialysierschläuche gefüllt. Saccharoselösung wurde bei den Membranen verwendet, mit denen kein osmotischer Schock durchgeführt worden war.

2.7. Beladung der biologischen Membranen mit Ionen

2.7.1 Verwendete Puffer

2.7.1.1 Erläuterungen zu den Puffern

Wenn an den Membranen der unterschiedliche Einfluß der verschiedenen Ionen bei physiologischem pH-Wert untersucht werden sollte, so besaßen die entsprechenden Kakodylat- bzw. physiologischen Puffer den pH-Wert 7,4 bzw. 7,2.

Bei den pH-Reihen wurde der pH-Wert im allgemeinen bei gleicher Konzentration der Salze variiert. Die Einstellung der gewünschten Werte erfolgte mittels HCl. Die Werte werden bei den entsprechenden Meßreihen aufgeführt.

Bei D_2O-Messungen in der FMIR-Küvette wurden Puffer in analogen Konzentrationen wie die H_2O-Puffer verwendet. Hierbei erfolgte die Einstellung der pD-Werte durch Titrieren mit DCl. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte wurden dabei an einem pH-Meter (Fa. Metrohm) in der pD-Lösung abgelesen.

Für Messungen in der Transmissionsküvette fand der H_2O-D_2O-Austausch in der Küvette statt. Zuvor war an den Membranen nach der unter Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Methode das gewünschte Ionenmilieu eingestellt worden.

2.7.1.2 Aufzählung der Pufferlösungen

1. Tris (1 mMol) - EDTA (1mMol)
2. 100 mMol NaCl, 5 mMol Na-Kakodylat
3. 100 mMol KCl, 5 mMol K-Kakodylat
4. 50 mMol $CaCl_2$, 5 mMol Ca-Kakodylat
5. Physiologische Lösung, bestehend aus NaCl 154 mMol, KCl 5,6 mMol, $CaCl_2$ 2,2 mMol, Na_2HPO_4 2,15 mMol, NaH_2PO_4 0,85 mMol *
6. Na-physiologische Lösung, bestehend aus NaCl 160 mMol, $CaCl_2$ 2,2 mMol, Na_2HPO_4 2,15 mMol, NaH_2PO_4 0,85 mMol*
7. K-physiologische Lösung, bestehend aus KCl 160 mMol, $CaCl_2$ 2,2 mMol, Na_2HPO_4 2,15 mMol, NaH_2PO_4 0,85 mMol*

---

*Diese physiologischen Lösungen wurden modifiziert nach der von Hughes (66) angegebenen Krebslösung

2.7.2 Nach der alten für Transmissionsmessungen üblichen Methode

Nach der für Transmissionsmessungen laborüblichen Methode wurden die Dialysen in Dialyseschläuchen durchgeführt. Dabei hatte die Temperatur 4° C zu betragen und die Pufferlösungen, die ständig gerührt wurden, mußten des öfteren gewechselt werden.

Zunächst fand eine dreißigstündige Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer statt. Danach wurde gegen die gewünschte Ionenlösung dialysiert. Bei Erythrozyten dauerte diese Dialyse 48 und bei Membranen aus Rattenhirn 20 Stunden (44). Letztgenannte Membranen wurden anschließend noch gegen neutralisiertes Wasser* dialysiert. Auf diese Weise sollte ein Ionenüberschuß vermieden werden, da bei der Filmherstellung eine Konzentrierung der Lösung stattfindet.

Nach Beendigung der Dialysen wurden aus den Membransuspensionen Filme hergestellt (Vgl. S. 23).

2.7.3 Nach der neuen Methode

Bei 4° Celsius wurden die Membranen in der Küvette nacheinander gegen die gewünschten Puffer dialysiert. Wie dem Abschnitt 2.2.3 zu entnehmen ist, hatte sich bei der Optimierung der FMIR-Küvette herausgestellt, daß eine Dialysedauer von 3 Stunden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/h je Küvettenkammer für den Austausch von Ionen ausreichend war. Daher wurden diese Dialysebedingungen einheitlich bei allen Pufferlösungen und Membrantypen (Erythrozytenmembranen, Myelin, die verschiedenen Membrantypen aus Rattenhirn), H_2O und D_2O angewendet. Somit reduzierte sich durch dieses neue Verfahren die Dialysedauer auf wenige Stunden. Nach der alten Methode wurden für Erythrozytenmembranen drei und für Membranen aus Rattenhirn zwei Tage benötigt.

---

*Hierzu wurde bidestilliertes Wasser mit Lauge auf pH 7,0 eingestellt.

2.8 Deuterierung der Membranen

Die Deuterierung der Membranen in der FMIR-Küvette erfolgte mittels Dialyse gegen D_2O und D_2O-Puffer (Vgl. Abschn. 2.2.3, Seite 16)

In der Transmissionsküvette wurde die Deuterierung mit Hilfe gesättigter NaBr- und $BaCl_2$-Lösungen durchgeführt. Mittels NaBr-Lösung wurde den Membranen teilweise Wasser entzogen (bis zu 60 %). Die $BaCl_2$-Lösung diente dazu, die Membranen wieder auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 90 % zu bringen. Der fortschreitende H_2O-D_2O-Austausch wurde anhand der OH (OD)-Streckschwingung des Wassers, die bei 2500 cm^{-1} für D_2O und bei 3395 cm^{-1} für H_2O liegt, überprüft (106). Im Mittel mußten die Salzlösungen dreimal ausgetauscht werden.

2.9 IR-Spektrograph und Aufnahme der Spektren

Alle Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Doppelstrahlspektrographen Modell 325 aufgenommen. Den Meßraum hielt ein Trockenluftspülgerät wasserdampf- und CO_2-frei. So konnten Energieverluste durch die Absorption dieser Moleküle vermieden werden. Die Messungen fanden bei folgender Geräteeinstellung statt:

Transmissionsküvette: Spaltprogramm 6,5, Verstärkung 2,5, Zeitkonstante 2, Geschwindigkeit 1.

FMIR-Küvette: Spaltprogramm 8, Zeitkonstante 4, Geschwindigkeit 1. Die Verstärkung und die Dehnung mußten in Abhängigkeit von der Substanzmenge und der jeweiligen Spiegeleinstellung variiert werden. Wenn im Text nichts anderes angegeben wird, so wurde die Küvette während der Messungen bei 20° Celsius thermostatisiert.

Die Empfindlichkeit des Gerätes wurde während der Messungen laufend überprüft.

3. Zur IR-spektroskopischen Analyse von Membranen

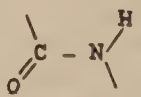
Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, sind Proteine, Lipide - von diesen in erster Linie die Phospholipide - und Wasser die wichtigsten Membranbestandteile. Die IR-Spektroskopie ermöglicht es nun, Aussagen über die Proteinkonformation einerseits und über die relative Ordnung in der Lipidphase andererseits zu machen. Aufgrund von Messungen mit Modellsubstanzen wurden Kriterien geschaffen, um Proteine und Lipide getrennt voneinander charakterisieren zu können. Auf die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden kann geschlossen werden, indem Spektren von nicht lipidextrahierten Membranen mit denjenigen von Lipidextrakten verglichen werden (89).

Dieses sei nur am Rande erwähnt, da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Membranen unter möglichst physiologischen Bedingengen zu untersuchen. Diese Bedingungen sind bei lipidextrahierten Membranen nicht erfüllt.

3.1 Die Konformationsanalyse von Proteinen

a) Von isolierten Proteinen und Polypeptiden

Wie aus den Abbildungen 4 a,b und 5 (Seite 4 und 5) zu ersehen ist, besitzen Proteine in ihrem Rückgrat in sich regelmäßig wiederholender Sequenz die Peptidgruppe:



Auf diese Gruppierung sind im IR-Spektrum neun Absorptionsbanden zurückzuführen, welche als Amid A, Amid B und Amid I-VII bezeichnet werden (67). Davon sind für die Konformationsanalyse von Proteinen die Amid-I- und Amid-II-Bande geeignet. An der Amid-I-Schwingung sind sowohl die C=O- und C-N-Valenzschwingung als auch die N-H-Deformationsschwingung beteiligt. Der größte Anteil der potentiellen Energie der Schwingung entfällt dabei auf die C=O-Valenz-

schwingung (68). Die Amid-II-Schwingung resultiert aus der Kombination der N-H-Deformations- und (C-N)-Streckschwingung. Davon beträgt der Anteil der N-H-Deformationsschwingung 60% (67).

Die Peptidgruppenschwingungen koppeln in regulären Peptidkettenkonformationen intramolekular über das Rückgrat und intermolekular über Wasserstoffbrücken. Miyazawa et al. (69) machten hierzu Berechnungen. Sie konnten zeigen, daß die Kopplungen in der α-Helix zur Folge haben, daß die Amid-I- und Amid-II-Schwingungen in jeweils zwei Schwingungen aufgespalten sind. In ß-Strukturen sind die beiden Amid-Schwingungen in jeweils vier Schwingungen aufgespalten. Von diesen Schwingungen sind bei antiparallelen Ketten drei und bei parallelen Ketten zwei IR-aktiv. Keine Bandenaufspaltung wird bei der Zufallsknäuelstruktur beobachtet. Der Grund ist, daß die Schwingungswechselwirkung zwischen benachbarten Peptidgruppen im Mittel Null ist. Die wichtigsten berechneten Frequenzen sowie Daten, die mit festen Proben von Polypeptiden sowie Faserproteinen* bekannter Konformation gefunden wurden, sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Wie man sieht, stimmen errechnete und gemessene Daten gut überein. Abweichungen sind auch bei globulären Proteinen recht gering. In einigen Fällen können jedoch Kettenlänge und Feuchtigkeitsgehalt eine Verschiebung der charakteristischen Frequenzen bewirken. In der Tabelle 6 sind die Schwingungsfrequenzen der Amid-I-Bande, die Susi et al. (71) mit den globulären Proteinen Myoglobin (MG = 16 900) und Lactoglobulin (MG = 37 100) in festem Zustand, in H_2O sowie D_2O erhalten hat, zusammengestellt. Werte von Faserproteinen, die von Krimm (72) stammen, dienen als Vergleich. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß zwischen festen und hydratisierten Proteinen keine Unterschiede bestehen. In einigen Fällen jedoch bewirkt die Deuterierung eine geringfügige Erniedrigung der Schwingungsfrequenz, die durch den N-H-Deformationsschwingungsanteil an der Amid-I-Schwingung bedingt wird.

---

*Man unterscheidet zwischen löslichen globulären Proteinen und unlöslichen Faserproteinen.

Konformation	Bezeichnung der Schwingung	Amid-I (cm^{-1}) berechnet	Amid-I (cm^{-1}) beobachtet	Amid-II (cm^{-1}) berechnet	Amid-II (cm^{-1}) beobachtet
Statistisches Knäuel*		1658	1656 (s)	1635	1635
α-Helix	$\nu_{\parallel}(0)$	1650 (s)	1650 (s)	1516 (w)	1516 (w)
	$\nu_{\perp}(2\pi/3,6)$	1646 (w)	1652 (m)	1546 (s)	1546 (s)
ß-Struktur, parallele Ketten	$\nu_{\parallel}(0,0)$	1648 (w)	1645 (w)	1530 (s)	1530 (s)
	$\nu_{\perp}(\pi,0)$	1632 (s)	1630 (s)	1550 (w)	1550 (w)
ß-Struktur, antiparallele Ketten	$\nu_{\parallel}(0,\pi)$	1685 (w)	1685 (w)	1530 (s)	1530 (s)
	$\nu_{\perp}(\pi,0)$	1632 (s)	1632 (s)	1510 (w)	
	$\nu_{\perp}(\pi,\pi)$	1668 (vw)		1550 (w)	

Tab. 5: Berechnete und beobachtete Wellenzahlen für die Amid-I- und Amid-II-Banden von Polypeptiden in verschiedenen Konformationen nach Miyazawa (69).

Die jeweiligen Schwingungen sind durch die Angabe des Infrarotdichroismus' indiziert. Bei den Faltblattstrukturen geben die Zahlen in den Klammern, die sich hinter den Bezeichnungen des Infrarotdichroismus' befinden, den Phasenwinkel der Schwingungen an. 0 = in Phase, π = aus der Phase. Die erste Zahl gibt den Phasenwinkel zwischen benachbarten intramolekularen Peptidgruppen an. Die zweite Zahl gibt den Phasenwinkel zwischen zwei intermolekular gekoppelten Peptidgruppen an. In den Bezeichnungen der α-Helix-Schwingungen treten die Phasenwinkel 0 und $2\pi/3,6$ auf. 3,6 ist die Zahl der Peptidreste pro Windung der α-Helix.

Intensitätsangaben: s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach

* Statistisches Knäuel = Zufallsknäuelkonformation

Konformation	Bezeichnung d. Schwingung	Zustand			Probe
		D_2O-L.	H_2O-L.	feste Probe	
antiparallele Faltblattstruktur	$\nu(\pi,0)$	1632	1632	1632	ß-Lactoglobulin
				1630-1634[a]	Faserproteine
	$\nu(0,\pi)$	1675	1690[b]	1690	ß-Lactoglobulin
				1695-1697[a]	Faserproteine
α-Helix	$\nu(0)$	1649[c]			ß-Lactoglobulin
		1650	1652	1652	Myoglobulin
				1650-1653[a]	Faserproteine
Ungeordnet	$\nu(u)$[d]	1643	1656		ß-Lactoglobulin
		1643	1656		α_s-Casein
				1660-1664[a]	Faserproteine

Tab. 6: Beobachtete Wellenzahlen von Amid-I- und Amid-I'-Banden von ß-Lactoglobulin, Myoglobin und α_s-Casein. Die Werte wurden von Susi et al. (71) erhalten. Sie werden ergänzt von Werten, die Krimm (72) mit Faserproteinen bekommen hat.

Erläuterungen: [a] Werte, die von Krimm stammen.
[b] Nicht ausgetauschtes Protein in D_2O.
[c] In einem gemischten Lösungsmittel aus D_2O und CH_3OD.
[d] Beobachteter Wert für eine Zufallsknäuelstruktur; der Wert muß nicht unbedingt identisch mit der Grundschwingungsfrequenz übereinstimmen.

Abkürzungen: d. = der, L. = Lösung

b) Von Proteinen in natürlichen Membranen

Eine große Anzahl von Untersuchungen mit Membranen verschiedener Herkunft hat gezeigt, daß obige Aussagen auch auf die Membranproteine zutreffen, die zu den globulären zählen (14,39). Häufig besitzen diese Sequenzen verschiedener Konformation. Dann befindet sich das Maximum der Bande bei der Wellenzahl, welche für die überwiegende Konformation charakteristisch ist. Für die anderen Konformationen zeigen sich je nach mengenmäßigem Anteil mehr oder weniger starke Schultern (27,28). Weitere Banden der Proteine, die auf Seitengruppen zurückzuführen sind, werden mit den Banden in der Tabelle A 1 aufgeführt.

c) Seltene Proteinkonformationen

Die bisherigen Ausführungen könnten den Leser zu der irrigen Auffassung verleiten, es existierten nur die in Tabelle 5 aufgeführten Konformationen. Dieses ist jedoch nicht der Fall. Zwar sind die oben genannten Konformationen energetisch bevorzugt,. Dennoch sind auch andere räumliche Anordnungen wie die "cross-ß"-Struktur (72-74, 67,76,107) und die Federkeratinstruktur (67,77) gefunden und auch bereits näher charakterisiert worden.

Das Federkeratin z.B. besteht aus polaren Ketten, die parallel zueinander verlaufend eine Faltblattstruktur bilden. Bezüglich dieser Struktur führten Krimm et al. (72) sowie Miyazawa et al. (69) Berechnungen durch. Die Amid-Banden haben demzufolge nachstehende Wellenzahlenwerte:

	Amid-I (cm^{-1})	Amid-II (cm^{-1})
$\nu(0,0)$ pol*	1648 (s)$_\perp$	1550 (s)$_\parallel$
$\nu(\pi,0)$ pol	1632 (vw)	1530 (w)

---

* Die Polarisation von $\nu(0,0)$ wird nicht von der Symmetrie bestimmt. Daher hängt die Polarisation von $\nu(0,0)_{pol}$ von der Richtung des Übergangsmomentes der Normalschwingung ab.

Weiterhin wurden unter bestimmten Bedingungen Konformationen beobachtet, die keiner der bekannten Strukturen zugeordnet werden konnten (79,94).

Susi (77) schreibt hierzu, daß stets eine beträchtliche Anzahl konformativer Alternativen in Betracht gezogen werden muß. Eine Äußerung von Graham et al. (29) zu den Konformationen von Proteinen soll wörtlich zitiert werden:

"Moreover, proteins are usually conformational structures often containing (a) only short segments in any one conformation and (b) sections which are unordered but not random, or helical but not precisely α- helical or folded parallel or anti-parallel, but not truly ß-structured."

Wenn also Wellenzahlenwerte der Amid-Banden nicht den oben erwähnten Konformationen (α-Helix, Zufallsknäuelstruktur oder ß-Konformation) zuzuordnen sind, muß auf eine davon verschiedene räumliche Anordnung geschlossen werden. Die Bildung solcher Strukturen dürfte unter extremen Bedingungen stattfinden (78,105).

3.2 Die Analyse der Phospholipide

a) Konformation

Aussagen über die Konformation der in den Phospholipiden (Lipiden) verankerten Fettsäuren lassen sich aufgrund von Banden im Wellenzahlenbereich < 1500 cm^{-1} machen. Eine besondere Rolle spielt hierbei eine bei 720 cm^{-1} liegende Bande.

Sie entsteht, wenn mindestens vier Methylengruppen in einer all-transplanaren Konformation angeordnet sind (81,82,87). Die steigende Anzahl derartig angeordneter CH_2-Gruppen bedingt eine Intensitätszunahme.

Die Aussagen, die man im obigen Wellenzahlenbereich be-

züglich der Phospholipide machen kann, beziehen sich auf die funktionellen Gruppen (81,82,87).

b) Die funktionellen Gruppen

Allen Phosphatiden gemeinsam sind die Fettsäuren, die in fast allen Fällen durch Esterbindung mit dem Alkohol (Glycerin oder Sphingosin) verbunden sind (70). Von den Schwingungen des zu untersuchenden Wellenzahlenbereichs können die Gerüstschwingungen, die im Wellenzahlenbereich $< 1500\ cm^{-1}$ angeregt werden (84), Auskunft geben über die Länge und den Sättigungsgrad der Fettsäuren. Die steigende Intensität einer bei 1435 cm^{-1} liegenden Bande ist ein Indiz dafür, daß die Zahl der Doppelbindungen zunimmt (83). Die wachsende Anzahl von Banden um 1250 cm^{-1} läßt auf die Verlängerung der Ketten schließen.

Weiterhin ist für alle Phosphatide eine zweifach veresterte Phosphorsäure charakteristisch (70). Eine Unterscheidung der Phospholipide ist möglich anhand der Aminosäure Serin sowie der Aminoalkohole Cholin und Colamin. Die Sphingolipide unterscheiden sich von den Glycerophosphatiden und Plasmalogenen durch eine Amidgruppe. Bei den Plasmalogenen fehlt die bei den anderen Phosphatiden vorhandene Ester-(C=O)-Gruppierung.

Im Anhang sollen in der Tabelle A_1 die wichtigsten IR-Banden den Schwingungen der Phospholipide und/oder Proteine zugeordnet werden. Der folgende Abschnitt dient der Vereinfachung dieser Liste. Er geht auf die durch Deuterierung bedingte Verschiebung der Amid-II-Bande ein.

3.3 Erläuterungen zur Bandenlage von Amid-II nach Deuterierung

Bei Deuterierung verschiebt sich die nun als Amid-II' bezeichnete Bande nach etwa 1450 cm^{-1} (85). Die starke Verschiebung resultiert aus dem großen NH-Deformationsanteil an der Amid-II-Schwingung.

In der Nähe dieser Wellenzahlen befinden sich die Banden der CH_3-asymmetrischen und CH_2-Deformationsschwingung. Außerdem befindet sich im Bereich der Amid-II'-Bande die Bande der HDO-Scherenschwingung (115,116). Sie entsteht, wenn auch nur Spuren von H_2O mit D_2O in Berührung kommen.

Die Bande ist außerdem von sehr hoher Intensität:

$$\varepsilon = 20 \pm 5 \quad *$$

und besitzt eine große Halbwertsbreite:

$$\Delta\nu\tfrac{1}{2} = 85 \pm 5 \text{ cm}^{-1} **$$

Daher überlagert sie die in dem Wellenzahlenbereich um 1455 cm^{-1} liegenden Banden häufig vollständig. Folglich kann die Amid-II'-Bande nur in seltenen Fällen zur Konformationsanalyse herangezogen werden***.

Allerdings ist nach Deuterierung häufig noch die Amid-II-Bande anzutreffen. Die Intensität dieser Bande hängt von der Menge der Proteine ab, bei denen der H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattfindet (49).

4. Messungen und Resultate mit Myelin

4.1 Erläuterungen zum Myelin

Die Nervenfasern der sogenannten markhaltigen Nerven, die die Hauptwege der schnellen Fortpflanzung der Nervenerregung sind, werden von der Myelinscheide umgeben.

---

* ε = Extinktionskoeffizient x 10^{-3} cm^2 mol^{-1}

** $\Delta\nu\frac{1}{2}$ = Halbwertsbreite bei maximaler Intensität

*** Aus diesem Grunde wird in den Diskussionen und Tabellen nicht auf die Amid-II'-Bande eingegangen.

Das Myelin wird von einer Zelle gebildet, die sich spiralig um die Nervenfaser, das Axon, wickelt (Vgl. Abb. 15). Auf diese Weise entsteht ein vielschichtiges Membransystem, bei dem lipid- und proteinhaltige Schichten - zwischen denen sich Cytoplasma befindet - miteinander abwechseln. Diese Struktur, welche keine Spezialisierung aufweist, paßt am besten in das "unit membrane" Konzept von Robertson (4).

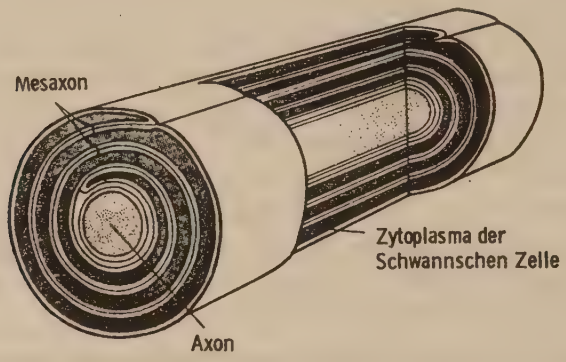


Abb. 15: Schematische Darstellung des Querschnitts durch eine markhaltige - dies bedeutet myelinisierte - Nervenfaser. (Nach Keidel (110))

Dem Myelin, das nur geringe enzymatische Aktivität besitzt, kommt in erster Linie die Aufgabe eines Isolators bei der Fortpflanzung des elektrischen Impulses während der Nervenerregung zu. Dieser Funktion sind die Lipidzusammensetzung und das Verhältnis von Proteinen zu Lipiden angepaßt. So ist das Verhältnis Cholesterin:Phospholipid im Myelin weit größer als in den bei der Nervenerregung beteiligten Membranen (101,102). Cholesterin reduziert die Permeabilität bimolekularer Phospholipidschichten und erhöht dadurch ihre Stabilität (98,103). Die wenigen metabolischen Prozesse, die an der Myelinmembran stattfinden, bedürfen eines geringen Proteingehalts. Das Lipid-Protein-Verhältnis im Myelin beträgt 4:1, während es in anderen Membranen geringer als 1:2 ist (103,104).

4.2 Untersuchungen an Myelin

Die Untersuchungen mit Myelin aus dem Cerebralcortex des Schweines, welches ohne große Probleme in ausreichenden Mengen zu gewinnen ist, dienten primär der Optimierung der Dialysebedinungen in der FMIR-Küvette und der Handhabung der Spiegel in den FMIR-Zusätzen. Aus diesem Grunde wurde Myelin einmal nach der üblichen Methode in Dialyseschläuchen gegen die Puffer dialysiert. Anhand von wiederholten Suspensionen und daran anschließenden Zentrifugationen fand bei einigen Versuchen die Deuterierung statt (Vgl. S. 17). Bei anderen Versuchen fanden die Deuterierung und die Beladung mit den diversen Ionen mittels Dialyse in der FMIR-Küvette statt (Vgl. S. 48).

Weiterhin wurde auch der Einfluß von Tris-EDTA-Puffer auf die Spektren der gegen die Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen untersucht. Dazu wurde in einer Versuchsserie gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert, in einer weiteren nicht.

Nach der Präparation von Myelin aus dem Cerebralcortex des Schweines (Vgl. S. 25) wurde das Myelin auf zweierlei Arten weiterbehandelt:

a) Das Myelin wurde in Dialyseschläuchen nacheinander gegen Tris-EDTA-Puffer und dann gegen Na^+-, K^+- oder Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert (Vgl. S. 48). Danach wurde zentrifugiert (100 000 g/1 h). Anschließend erfolgte entweder die Deuterierung mittels der auf S. 17 beschriebenen Methode oder das Myelin wurde für H_2O-Messungen sofort in die Küvette gefüllt.

b) Das Myelin wurde nach der Präparation abzentrifugiert (100 000 g/1 h) und in die Küvette gefüllt. In dieser fanden nacheinander die Dialysen gegen H_2O, D_2O oder gegen das gewünschte Ionenmilieu statt.

4.2.1 Einfluß verschiedener Kationen bei pH und pD 7,4

4.2.1.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

Myelin wurde nach der Präparation so, wie es in Abschnitt 4, Pkt.b beschrieben ist, weiterbehandelt. Dann wurde nacheinander gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA-, 3. K^+-Kakodylat, 4. Na^+-Kakodylat-, 5. K^+-Kakodylat-Puffer dialysiert.(Beschreibung der Dialysebedingungen S.16)

(ii) In D_2O

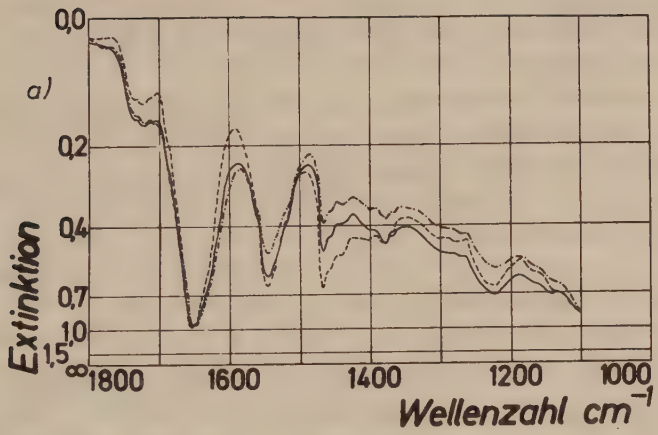
a) Myelin wurde nach dem in Abschn.4.2.a beschriebenen Verfahren weiterbehandelt. Nach vorheriger Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer wurde die Substanz entweder mit K^+-, Na^+- oder Ca^{2+}-Ionen beladen und anschließend deuteriert.

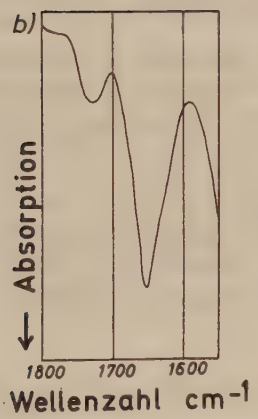
b) Nach der Durchführung des unter Abschn.4.2.b erwähnten Verfahrens fanden folgende Dialysen statt: gegen 1. D_2O, 2. Tris-EDTA-, 3. K^+-Kakodylat-, 4. Na^+-Kakodylat-Puffer

4.2.1.2 Resultate

(i) In H_2O (Abb. 16a,b,c und Tab. A 2)

Die Bande der C=O-Valenzschwingung zeigt keine Kationenabhängigkeit. Sie hat ein Maximum bei 1725 cm^{-1} und Schultern bei 1740 und 1712 cm^{-1}. Das nur gegen H_2O dialysierte Myelin besitzt ein Maximum bei 1728 cm^{-1}.
Die Amid-I-Bande besitzt ein 1652 cm^{-1} Maximum mit einer Unsymmetrie bei 1647 cm^{-1}. Die Bande des Na^+-Myelins ist gegenüber derjenigen des K^+-Myelins beidseitig - an der niederfrequenten Seite stärker - verschmälert. Wie das Spektrum des wieder gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysierten Myelins zeigt, ist die Verschmälerung reversibel. Daß die Schulter bei 1645 cm^{-1} von der Gegenwart der Kationen herrührt, ist an der Amid-I-Bande des nur gegen H_2O dialysierten Myelins zu sehen. Wie die Abb. 16 b zeigt, besitzt die Bande ein Maximum bei 1652 cm^{-1}. Dabei fehlt jegliche Unsymmetrie.





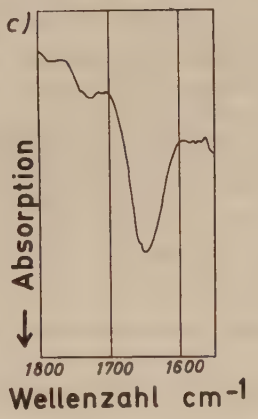


Abb. 16a: Spektren von Myelin, welches zuerst gegen H_2O und dann nacheinander gegen 1. Tris-EDTA-, 2. K^+-Kakodylat, 3. Na^+-Kakodylat-, 4. K^+-Kakodylat-Puffer dialysiert wurde.
—— K^+, --- Na^+, -.-.- K^+ (nach Rückdialyse)

Abb. 16b: Spektrum von Myelin, welches nur gegen H_2O dialysiert wurde.

Abb. 16c: Spektrum von Myelin, welches nur gegen D_2O dialysiert wurde.

Die Amid-II-Bande hat sowohl mit K^+ - in beiden K^+-Spektren - als auch mit Na^+ ein 1545 cm^{-1} Maximum mit Unsymmetrien bei 1562 und 1515 cm^{-1}.
Die bei 1467 cm^{-1} liegende Bande der CH_2-Deformationsschwingung ist von mittlerer Intensität und besitzt eine Schulter bei 1455 cm^{-1}, die der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung zuzuordnen ist. Eine weitere Schulter bei 1437 cm^{-1} kann der CH_2-Deformationsschwingung, die bei einer Gruppierung $-\overset{|}{C}=\overset{|}{C}-CH_2-$ auftritt (83), zugeordnet werden. Die letztgenannte Schulter ist mit Na^+ etwas kräftiger als mit K^+.
Eine bei 1405 cm^{-1} befindliche Schulter an der bei 1377 cm^{-1} liegenden Bande der CH_3-symmetrischen Valenzschwingung ist der der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung zuzuordnen. Eine weitere Schulter an der Bande der CH_3-symmetrischen Valenzschwingung dürfte der CH_2-Torsionsschwingung zuzuordnen sein. Sie befindet sich bei 1365 cm^{-1}.
Im weiteren Spektrenverlauf zeigen sich sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ Schultern bei 1310 cm^{-1} und 1272 cm^{-1}. Beide könnten auf $(CH)_2$-Nickschwingungen in den Fettsäureresten der Phospholipide zurückzuführen sein (83).
Die Bande der P=O-Valenzschwingung ist in allen Spektren bei 1225 cm^{-1} und die Schulter der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung von Estern bei 1170 cm^{-1} anzutreffen. Eine weitere Schulter bei 1140 cm^{-1} ist der C-O-C-Valenzschwingung in Zuckermolekülen zuzuordnen (88).

(ii) In D_2O

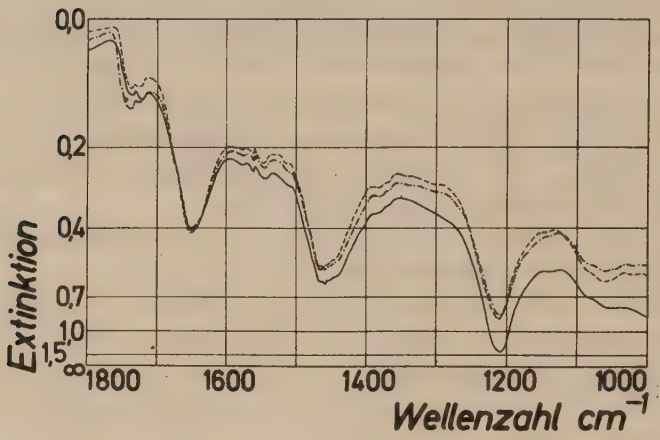
a) Bei Weiterbehandlung des Myelins nach Verfahren 4.2.a (Vgl. S. 59) (Abb. 17, Tab. A 2)

Die Bande der C=O-Valenzschwingung ist mit allen Kationen aufgespalten. Dabei gleicht sich die Bandenaufspaltung im Spektrum des Na^+- und Ca^{2+}-Myelins. Der ähnliche Verlauf mit Na^+ und Ca^{2+} kann durch das sich wenig unterscheidende elektrische Feld dieser beiden Kationen erklärt werden (108). Die Amid-I-Bande, die das Maximum bei 1650 cm^{-1} besitzt, zeigt in allen Spektren eine leichte Unsymmetrie bei 1637 cm^{-1}.

Auch die Amid-II-Bande der Proteine, die noch nicht oder nur unvollständig deuteriert sind, zeigt keine Kationenabhängigkeit. Sie befindet sich jeweils bei 1545 cm^{-1}. Eine weitere schwache Bande im Wellenzahlenbereich 1600-1500 cm^{-1} befindet sich in allen Spektren der Abb. 17 bei 1577 cm^{-1}. Sie dürfte der CO_2^--asymmetrischen Deformationsschwingung zuzuordnen sein.
Auch an der Schulter bei 1515 cm^{-1} läßt sich kein unterschiedlicher Kationeneinfluß feststellen.
Von den im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} liegenden Banden weist nur die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung eine kationenabhängige Position auf. Sie befindet sich mit K^+ und Ca^{2+} bei 1457 cm^{-1}. Im Spektrum des Na^+-Myelins liegt sie bei 1460 cm^{-1}.
Im weiteren Spektrenverlauf bis hin zu 1040 cm^{-1} sind keine Unterschiede zu verzeichnen. Hier soll lediglich bemerkt werden, daß die bei 1210 cm^{-1} liegende Bande der D_2O-Scherenschwingung aufgrund ihrer starken Verbreiterung die Banden und Schultern des Wellenzahlenbereichs 1300-1100 cm^{-1} verdeckt. Die Bande im Wellenzahlenbereich 1125-1000 cm^{-1} besitzt jeweils ein Maximum bei 1065 cm^{-1} und eine sehr ausgeprägte Schulter bei 1085 cm^{-1}. Wie der Tabelle A 1 entnommen werden kann, ist eine eindeutige Zuordnung wegen der vielen Schwingungen in diesem Wellenzahlenbereich nicht möglich.

b) Bei Weiterbehandlung des Myelins nach Verfahren 4.2.b (Vgl. S. 59) (Abb. 18, Tab. A 2)

Bis auf den Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} unterscheiden sich die Spektren von Tris-EDTA-, K^+- und Na^+-Myelin wenig. Die wesentlichen Befunde sind:
Die Amid-I-Bande des Myelins, welches gegen Tris-EDTA-, K^+-Kakodylat- oder Na^+-Kakodylat-Puffer dialysiert wurde, besitzt ein 1648 cm^{-1} Maximum mit einer schwachen Schulter bei 1637 cm^{-1}. Die Bande des nur gegen D_2O dialysierten Myelins weist ein Maximum zwischen 1647-1652 cm^{-1} und eine Schulter bei 1656 cm^{-1} auf.



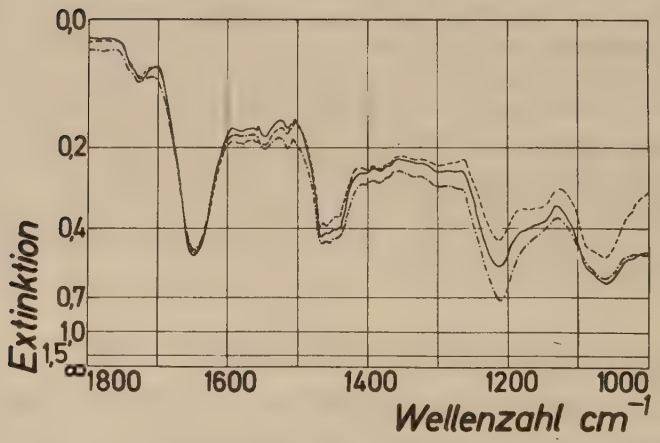


Abb. 17: Spektren von K^+-, Na^+- und Ca^{2+}-Myelin in D_2O. (Die Dialysen fanden in Dialyseschläuchen statt).
—— K^+, --- Na^+, -.-.- Ca^{2+}

Abb. 18: Spektren von D_2O-Myelin, welches nacheinander gegen 1. Tris-EDTA-, 2. K^+-Kakodylat-, 3. Na^+-Kakodylat-Puffer dialysiert wurde.
—— Na^+, --- K^+, -.-.- Tris-EDTA

Die Amid-II-Bande der nicht oder nur teilweise deuterierten Proteine weist jeweils ein Maximum bei 1546 cm^{-1} mit einer Unsymmetrie bei 1515 cm^{-1} auf. Erstere Absorption ist auf N-H-Übergangsmomente senkrecht zur Helixachse, letztere Absorption auf N-H-Übergangsmomente parallel zur Helixachse zurückzuführen.
Die im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} befindliche intensive Bande besitzt ein zwischen 1465-1440 cm^{-1} verlaufendes Maximum. Die Absorption bei 1465 cm^{-1}, die der CH_2-Deformationsschwingung zuzuordnen ist, besitzt mehr Intensität als die Absorption bei 1440 cm^{-1} (CH_2-Deformationsschwingung bei einer Methylengruppe, die sich neben einer Doppelbindung befindet). Die Bande der CH_2-Deformationsschwingung befindet sich mit K^+ und Tris-EDTA um drei Wellenzahlen niedriger als mit Na^+.

Die hohe Intensität der Bande im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} dürfte auf die HDO-Scherenschwingung und die Amid-II-Schwingung zurückzuführen sein. Schultern an dieser Bande, die sich bei 1405 und 1382 cm^{-1} befinden, dürften der CO_2^--symmetrischen Deformationsschwingung und OH-Deformationsschwingung zuzuordnen sein (130). Eine weitere bei 1368 cm^{-1} kann der CH_2-Torsionsschwingung zugeordnet werden (83).
Der weitere Spektrenverlauf weist in allen Fällen eine sehr schwache Bande bei 1300 cm^{-1}, die Bande der D_2O-Scherenschwingung bei 1215 cm^{-1} und eine sehr starke Schulter bei 1145 cm^{-1} auf, die der C-O-C Valenzschwingung der Zucker zugeordnet werden kann (88).

Die intensive Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} besitzt ein Maximum bei 1062 cm^{-1}. Eine sehr ausgeprägte Schulter in den Na^+- und K^+-Spektren und eine sehr schwache Schulter im Tris-EDTA-Spektrum befinden sich bei 1085 cm^{-1}. Ferner weisen sowohl das Na^+-Spektrum als auch das K^+-Spektrum Schultern bei 1022 cm^{-1} auf. Mit Tris-EDTA fehlt eine Schulter bei dieser Wellenzahl. Wie schon früher erwähnt wurde, ist es wegen der vielen Banden in diesem Wellenzahlenbereich (Vgl. Tab. A 1) schwierig, eine Bandenzuordnung zu machen.

4.2.2 Temperaturabhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen

4.2.2.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) Bei Temperaturen von 20° und 35° C

Myelin wurde nach der Präparation, wie in Abschnitt 4.2.b auf Seite 59 erwähnt, für das Einfüllen in die Küvette vorbereitet. In der Küvette erfolgten dann die Dialysen gegen 1. H_2O, 2. K^+-Kakodylat- oder Na^+-Kakodylat-Puffer. Es wurden Messungen bei 20° und 35° Celsius durchgeführt. Die Temperaturen wurden mittels Thermostaten in der Küvette eingestellt. Nach Erreichen der Temperatur wurde 30 Minuten bis zum Meßbeginn gewartet.

(ii) Bei Temperaturen von 50° und 70° C

Myelin wurde nach der Präparation abzentrifugiert (100 000 g/1 h). Danach wurde die Substanz auf zwei Reagenzgläser verteilt. Der Inhalt des einen Reagenzglases wurde auf 50° C, der des anderen auf 70° C erwärmt. Die Temperaturen wurden für eine halbe Stunde belassen. Anschliessend wurde das Material in FMIR-Küvetten gefüllt. Es erfolgten nacheinander die Dialysen gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA, 3. K^+-Kakodylat-, 4. Na^+-Kakodylat-Puffer.* Die Messungen wurden bei 20° C durchgeführt.

4.2.2.2 Resultate

(i) Bei Temperaturen von 20° und 35° C (Abb. 16 a)

Sowohl Na^+ als auch K^+-Myelin zeigen bei 20° und 35° C keine unterschiedlichen Spektren. Der Spektrenverlauf gleicht dem, der in Abb. 16 a zu sehen ist. Das Myelin, welches auf Temperaturabhängigkeit untersucht wurde, war nicht gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert worden. Dagegen war dies beim Myelin der Fall, dessen Spektren in Abb. 16 a zu sehen sind. Daher kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß stattfindende oder ausbleibende Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer keinen Unterschied im Spektrenverlauf bewirkt - zumindest bei Myelin.

* Die Dialysen fanden bei 4° C statt.

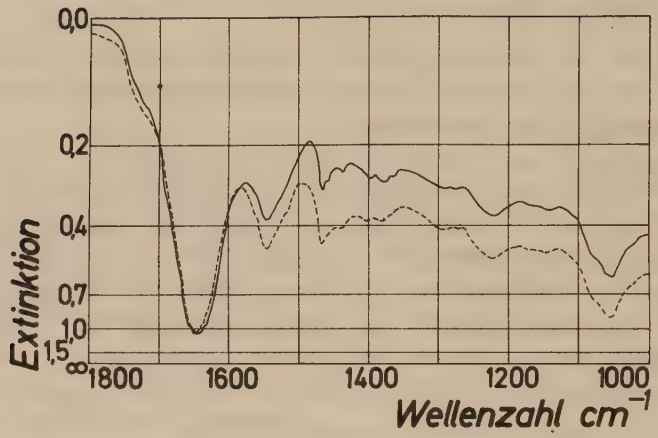
(ii) Bei Temperaturen von 50° und 70° C

a) 50° C (Abb 19, Tab. A 2)

Sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ befindet sich bei 1740 cm^{-1} eine sehr starke Schulter an der Amid-I-Bande. Diese ist der C=O-Valenzschwingung zuzuordnen.
Die Amid-I-Bande des K^+-Myelins besitzt ein zwischen 1640-1645 cm^{-1} verlaufendes Maximum, welches Unsymmetrien bei 1630 und 1652 cm^{-1} aufweist. Ferner liegt eine sehr ausgeprägte Schulter bei 1690 cm^{-1}. Auch an der bei 1645 cm^{-1} befindlichen Bande des Na^+-Myelins liegt neben der Schulter bei 1652 cm^{-1} eine sehr schwach angedeutete bei 1690 cm^{-1} vor. Was die Bandenbreite anbetrifft, so ist die Bande des K^+-Myelins beidseitig gegenüber der des Na^+-Myelins verbreitert.
Die Amid-II-Bande besitzt in beiden Spektren ein Maximum bei 1545 cm^{-1}. Mit Na^+ liegen zusätzlich Schultern bei 1562 und 1515 cm^{-1} vor.
Die bei 1467 cm^{-1} liegende Bande der CH_2-Deformationsschwingung ist im Spektrum des Na^+-Myelins derart zu kleinen Wellenzahlen verbreitert, daß die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung verdeckt. ist. Dagegen weist das Spektrum des K^+-Myelins eine Schulter bei 1457 cm^{-1} auf. Während im Na^+-Spektrum eine starke Schulter bei 1440 cm^{-1} vorliegt, weist das K^+-Spektrum eine schwache Bande bei 1436 cm^{-1} auf. Es ist anzunehmen, daß das stärkere elektrische Feld von Na^+ die Verschiebung der CH_2-Deformationsschwingung - bei CH_2-Gruppen in Nachbarschaft einer Doppelbindung (83) - zu höheren Wellenzahlen bewirkt.

Wie auch die Bande der CH_2-Deformationsschwingung liegt die schwache Bande der CH_3-symmetrischen-Deformationsschwingung im Spektrum des Na^+-Myelins um 2 cm^{-1} höher als im Spektrum des K^+-Myelins. Sie befindet sich bei 1380 cm^{-1}.

Während mit Na^+ die CH_2-Torsionsschwingung nur als Schulter bei 1365 cm^{-1} angedeutet ist, besitzt das K^+-Spektrum bei der gleichen Wellenzahl eine schwache Bande.
Im weiteren Spektrenverlauf befindet sich eine schwache Ban-



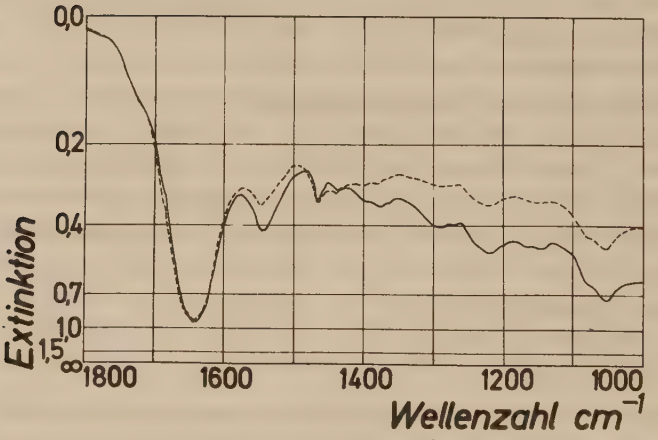


Abb. 19: Spektren von K^+- und Na^+-Myelin, welches eine halbe Stunde auf 50° C erwärmt war.
—— K^+, --- Na^+

Abb. 20: Spektren von K^+- und Na^+-Myelin, welches eine halbe Stunde auf 70° C erwärmt war.
—— K^+, --- Na^+

de bei 1295 cm^{-1} mit Na^+ und bei 1290 cm^{-1} mit K^+. Es könnte sich um die Bande der OH-Deformationsschwingung in der (P)-OH Gruppe handeln (96).

In beiden Fällen liegt die Bande der P=O-Valenzschwingung bei 1220 cm^{-1}.

Im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} ist die stärkste Absorption bei 1055 cm^{-1} mit Na^+ und bei 1052 cm^{-1} mit K^+. In beiden Spektren befinden sich eine ausgeprägte Schulter bei 1080 cm^{-1} und eine schwache Schulter bei 1020 cm^{-1}. Das K^+-Spektrum weist zusätzlich eine Schulter bei 1062 cm^{-1} auf. Auch in diesem Falle würden Bandenzuordnungen in den Bereich der Spekulation gehören.

b) 70° C (Abb 20, Tab A 2)

Auch die Na^+- und K^+-Spektren des Myelins, welches auf 70° C erwärmt wurde, zeigen im Wellenzahlenbereich der C=O-Valenzschwingung keine Unterschiede.

Die Amid-I-Bande des K^+-Myelins ist im Vergleich zu der des Na^+-Myelins an der höherfrequenten Seite verschmälert und besitzt ein Absorptionsmaximum zwischen 1635-1640 cm^{-1}. Bei 1655 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} befindliche Schultern liegen im K^+- sowie Na^+-Spektrum vor. Mit Na^+ liegt die Amid-I-Bande jedoch bei 1642 cm^{-1} und ist nicht verbreitert.

Die Amid-II-Bande besitzt im K^+-Spektrum ein Maximum bei 1545 cm^{-1} und mit Na^+ bei 1547 cm^{-1}. Die Bande ist mit Na^+ viel weniger intensiv als mit K^+.

Die Bande der CH_2-Deformationsschwingung, die in beiden Fällen die gleiche Intensität besitzt, befindet sich mit Na^+ bei 1467 cm^{-1} und mit K^+ bei 1465 cm^{-1}. In beiden Spektren zeigt sich für die CH_3-asymmetrische Deformationsschwingung eine Schulter bei 1455 cm^{-1}. Im Na^+-Spektrum ist die Absorption intensiver als im K^+-Spektrum.

Im Wellenzahlenbereich von 1400-1260 cm^{-1} ist die Absorptionsintensität des Na^+-Myelins geringer als die des K^+-Myelins. Die Banden des K^+-Myelins befinden sich bei

1395, 1377, 1365, 1295 und 1270 cm^{-1} und die des Na^+-Myelins bei 1400, 1380 und 1295 cm^{-1}.

Die Bande der P=O-Valenzschwingung liegt in beiden Spektren bei 1220 cm^{-1}. Mit K^+ weist die Bande eine Schulter bei 1237 cm^{-1} auf.

Was den Bandenverlauf zwischen 1100-1000 cm^{-1} anbetrifft, so befinden sich sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ das Absorptionsmaximum bei 1052 cm^{-1} und eine sehr ausgeprägte Schulter bei 1080 cm^{-1}.

c) Vergleich der Spektren des auf 50° und 70° C erhitzten Myelins

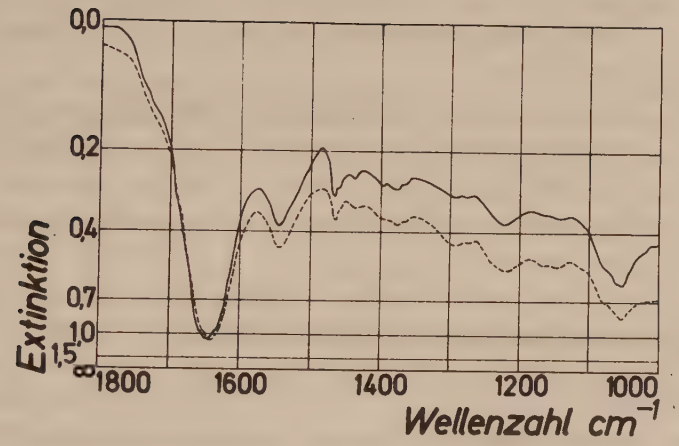
Folgende wesentlichen Unterschiede bestehen zwischen dem auf 50° C und auf 70° C erwärmten K^+- bzw. Na^+-Myelin:

α) Vergleich der K^+-Spektren (Abb. 21)

1. Die Amid-I-Bande besitzt bei 50° C ein Maximum bei 1640 cm^{-1} und bei 70° C eines, welches sich zwischen 1635-1640 cm^{-1} erstreckt.
2. Die Intensität der CH_2-Deformationsschwingung ist ist bei 70° C geringer als bei 50° C; außerdem ist bei 70° C die Schulter der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung schwächer als bei 50° C.
3. Die Intensität der Absorption bei 1365 cm^{-1} ist bei 70° C geringer als bei 50° C.
4. Die Intensität der Absorption bei 1300 cm^{-1} ist bei 70° C geringer als bei 50° C.
5. Die Schultern bei 1062 cm^{-1} und 1020 cm^{-1}, die bei 50° C vorliegen, sind bei 70° C verschwunden.

ß) Vergleich der Na^+-Spektren (Abb. 22)

1. Die Amid-I-Bande besitzt bei 50° C ein Maximum bei 1654 cm^{-1} und bei 70° C ein Maximum bei 1642 cm^{-1}.
2. Die Intensität der Amid-II-Bande ist bei 70° C viel geringer als bei 50° C.



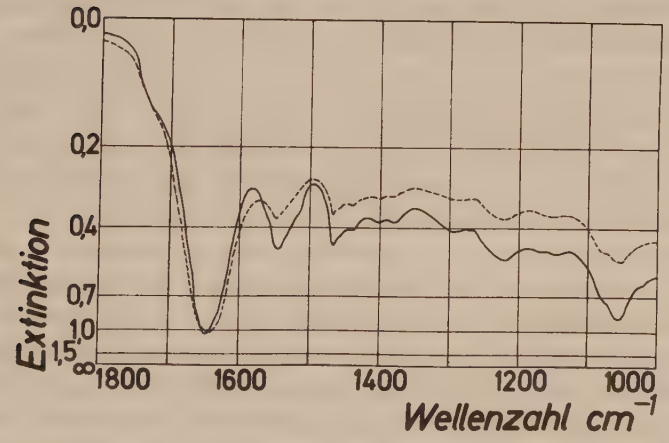


Abb. 21: Spektren von K^+-Myelin, welches eine halbe Stunde auf 50° (70°) C erwärmt war.
—— 50° C, --- 70° C

Abb: 22: Spektren von Na^+-Myelin, welches eine halbe Stunde auf 50° (70°) C erwärmt war.
—— 50° C, --- 70° C

3. Bei 70° C ist die Absorptionsintensität der Banden im Wellenzahlenbereich 1467-1200 cm^{-1} geringer als bei 50° C.
4. Während bei 50° C zwei Banden bei 1145 und 1170 cm^{-1} vorliegen, existiert bei 70° C nur eine Bande bei 1152 cm^{-1}.
5. Die Schulter bei 1080 cm^{-1} ist bei 70° C kräftiger als bei 50° C.

4.3 Diskussion der Resultate mit Myelin

a) Proteine

Die symmetrische Amid-I-Bande des hydratisierten Myelins läßt aufgrund des bei 1652 cm^{-1} liegenden Maximums und des Fehlens einer Schulter bei den für ß-Konformation charakteristischen Wellenzahlen nur auf α- und/oder Zufallsknäuelkonformation der Proteine schließen (Vgl. Abb. 16 b).

Nach der Dialyse gegen den K^+- als auch Na^+-Kakodylat-Puffer zeigt sich zusätzlich eine schwache Schulter bei 1645 cm^{-1} (Vgl. Abb. 16 a). Ihr Entstehen dürfte auf eine Konformationsumwandlung in Membranproteinen zurückzuführen sein. Dabei müßten Übergangsstrukturen, wie sie in Abschnitt 3.1. c erwähnt werden, entstanden sein. Daß die Bande des Na^+-Myelins gegenüber der des K^+-Myelins verschmälert ist - und zwar an der niederfrequenten Seite stärker -, ist nicht auf eine unterschiedliche Lage der Bande der H_2O-Scherenschwingung zurückzuführen. Diese Schlußfolgerung kann aus den Spektren des deuterierten Myelins gezogen werden. Auch bei diesen ist die Amid-I-Bande mit K^+ gegenüber der mit Na^+ verbreitert.

Da die Bandenverbreiterungen durch das Überlappen von Banden entstehen (72), dürfte die Verbreiterung bei kleinen Wellenzahlen durch einen höheren Anteil von ß-Konformation bedingt sein. Der Abb. 17 nach zu urteilen, würde dann die Menge von Proteinen in ß-Struktur in Abhängigkeit von den

Kationen in Richtung $Na^{+} \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow K^{+}$, also in Richtung des abnehmenden elektrischen Feldes (108), zunehmen.

Bereits beim nur gegen D_2O dialysierten Myelin (Abb 16 c) liegen im Gegensatz zum nur gegen H_2O dialysierten Myelin andere Strukturen als α-und/oder Zufallsknäuelkonformation vor. Hierauf läßt der unsymmetrische Bandenverlauf mit einem Maximum zwischen 1647-1652 cm^{-1} und einer Schulter bei 1656 cm^{-1} schließen.

Während die Kationen beim hydratisierten Myelin die Bildung von Strukturen, die nicht zugeordnet werden können, bewirken, induzieren sie beim deuterierten Myelin die Bildung von ß-Struktur. Hierauf läßt die bei 1637 cm^{-1} befindliche Schulter schließen (Tab. A 1).

Wie den Abbildungen 17 und 18 zu entnehmen ist, besitzt die Amid-I-Bande des Myelins, das nach den Verfahren 4.2.a und 4.2.b mit Kationen beladen wurde, das Maximum bei 1650 cm^{-1} bzw. 1648 cm^{-1}. Zu derartigen Verschiebungen der Amid-I-Bande berichten Graham et al. (29), daß sie von Präparation zu Präparation stattfinden, auch wenn peinlichst darauf geachtet wird, Unterschiede beim Präparationsablauf zu vermeiden. Mithin dürfte es sich in beiden Fällen um die Bande der Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation handeln.

Die Temperaturerhöhung des hydratisierten K^{+}- und Na^{+}-Myelins auf 35° C hat keine Konformationsumwandlung zur Folge. Dieses ist daraus ersichtlich, daß die Spektren, die bei 20° und 35° C aufgenommen wurden, identisch sind (Abb. 16). Bei 50° C scheint der stark veränderte Bandenverlauf von Amid-I und die Vergrößerung des Intensitätsverhältnisses Amid-I zu Amid-II den Beginn einer Denaturierung anzuzeigen. Bei 70° C muß die Denaturierung noch weiter fortgeschritten sein, da sich der Bandenverlauf noch stärker verändert und sich das Intensitätsverhältnis Amid-I zu Amid-II bei den Na^{+}-Erythrozytenmembranen nochmals vergößert hat.

Bei beiden Temperaturen unterscheidet sich der Einfluß

von Na^+ und K^+ auf die Konformation der Proteine (Siehe Abb. 19 u. 20). *

Aufgrund der bei 1690 cm^{-1} liegenden Schulter muß in allen Fällen antiparallele ß-Struktur entstanden sein (Vgl. Tab. 5). Ansonsten müssen sich noch weitere Konformationen gebildet haben, die weder α- noch Knäuel- noch ß-Konformationen sind.

Nach Astbury et al. (108) laufen Denaturierungen mindestens über ein Zwischenstadium ab, das als Intermediärzustand bezeichnet wird. Bei der endgültigen Denaturierung nehmen die Proteine die Konformation des ß-Keratins an (108). Die Tatsache, daß sich das Intensitätsverhältnis von Amid-I zu Amid-II fortschreitend verringert, könnte ebenfalls als Kriterium für die Bildung einer seltenen Struktur der Proteine gewertet werden. Die Konformation müßte nämlich eine solche Änderung erfahren, daß die N-H-Deformationsschwingung an Intensität verliert. Bei 70° C ist das Intensitätsverhältnis Amid-I zu Amid-II mit Na^+ größer als mit K^+. Da, wie schon bereits früher erwähnt wurde, Na^+ ein größeres elektrisches Feld als K^+ besitzt, kann der Unterschied in den Intensitätsverhältnissen auf das verschieden große elektrische Feld zurückgeführt werden.

b) Phospholipide

In dieser Arbeit sollte vorrangig auf die Konformation der Membranproteine und deren Abhängigkeit von diversen Parametern eingegangen werden. Daher wird die Beeinflussung der Banden, die auf die Schwingungen in den Phospholipidmolekülen zurückzuführen sind, nur kurz diskutiert.

Zunächst zur Kationenabhängigkeit der Phospholipidbanden des H_2O Myelins: Wie den Spektren der Abb. 16 a zu entnehmen ist, liegen die Banden mit K^+ und Na^+ bei den gleichen Wellenzahlen. Jedoch bestehen Intensitätsunterschiede der bei 1437 cm^{-1} liegenden Bande. Auch hier dürften die unterschiedlich großen Ionenradien und die damit verbundenen Unterschiede in der Größe des elektrischen Feldes von Bedeu-

* Eine Erklärung dieses Unterschiedes ist z.Zt. leider noch nicht möglich.

tung sein (108).

Nun zur Temperaturabhängigkeit der Phospholipidbanden des H_2O-Myelins: Auch bei 35° C unterscheiden sich die Spektren des K^+- und Na^+-Myelins nur in der Intensität der eben genannten Bande. Hingegen befinden sich, wie den Abbildungen 19 bzw. 20 zu entnehmen ist, in den Spektren des auf 50° bzw. 70° C erhitzten Myelins eine Vielzahl von Banden mit Na^+ bei zwischen 3-5 cm^{-1} höheren Wellenzahlen als mit K^+. Auch hier dürfte die unterschiedliche Lage der Banden auf die Kationengröße von Na^+ und K^+ zurückzuführen sein.

Wie bereits bezüglich der Struktur der Proteine erwähnt, zeigt sich bereits bei 50° C eine Konformationsumwandlung an, die mit steigender Temperatur zunimmt (70° C). Nach Chapman (109) muß bei einer Konformationsumwandlung der Proteine in einer Membran auch eine Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden stattfinden. Dadurch könnte eine Phasenumwandlung der Phospholipide (87) und eine damit verbundene veränderte (verstärkte) Wechselwirkung mit Kationen induziert werden. Daß Phasenveränderungen der Lipide stattgefunden haben müssen, zeigt auch der Vergleich der Spektren, die von auf 20°, 50° und 70° C erhitztem Myelin aufgenommen wurden.

Auch in den D_2O-Spektren läßt die Amid-I-Bande auf eine, wenn auch geringere, Konformationsumwandlung der Proteine, also auch Phasenveränderung der Lipide, schließen. Der verschieden große Ionenradius - im Falle von Ca^{2+} auf das einwertige Kation bezogen (108) - macht sich nur an der Bande der CH_3-asymmetrischen-Deformationsschwingung bemerkbar. Sie liegt mit Na^+ um einige Wellenzahlen höher als mit den beiden anderen Kationen (Vgl. 17,18 und Tab. A 2).

c) Wertung der Methoden a und b

Zunächst soll noch einmal kurz an die beiden Methoden erinnert werden. Nach der Methode a wurde das Myelin in Dialyseschläuchen dialysiert. Nach der Methode b fand die Dialyse in der FMIR-Küvette statt. Der Vergleich der Abbil-

dungen 17 (Methode a) und 18 (Methode b) zeigt, daß der Bandenverlauf der Spektren von Abb. 18 im Wellenzahlenbereich 1500-1100 cm^{-1} mehr Feinstrukturierung aufweist, als es in Abb. 17 der Fall ist. Ansonsten waren keine Unterschiede festzustellen. Somit ist die Dialyse in der Küvette auf jeden Fall gleichwertig - wenn nicht sogar besser - wie die Dialyse in Dialyseschläuchen. Bei biologischem Material, bei dem der Zeitfaktor eine wichtige Rolle spielt, ist sie auf alle Fälle vorzuziehen. Denn, wie auf Seite 48 erwähnt, dauert die Dialyse in der Küvette wesentlich kürzer als in den Dialyseschläuchen.

4.4 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den in der Literatur beschriebenen

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden bislang bei IR-spektroskopischen Untersuchungen von Myelin nur Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation gefunden (98,102). Allerdings wurden die Messungen von Jenkinson et al. (98) sowie von Hulcher(102) mit reinem Myelin durchgeführt, welches nicht zuvor gegen Puffer dialysiert worden war. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde bei Myelin, welches lediglich gegen H_2O dialysiert worden war, nur α- und/oder Zufallsknäuelkonformation gefunden. Hingegen ergaben die Messungen der vorliegenden Arbeit, daß im Myelin, welches zuvor gegen Puffer dialysiert worden war, neben α- und/oder Zufallsknäuelstruktur noch eine andere - eine Zwischenstruktur - vorliegen muß (Vgl. S. 54). Somit dürften die Kationen die Konformationsumwandlung in Proteinen des Myelins bewirkt haben.

Bei Versuchen mit Myelin in D_2O liegt ein etwas anderer Sachverhalt vor. Jenkinson stellte bei deuteriertem Myelin ebenfalls nur α- und/oder Zufallsknäuelstruktur fest. In der vorliegenden Arbeit hingegen zeigt das Spektrum des nur gegen D_2O deuterierten Myelins ein Maximum zwischen 1647-1652 cm^{-1} und eine Schulter bei 1656 cm^{-1}. Dieser Bandenver-

lauf läßt auf das Enstehen von Zwischenstrukturen durch die Deuterierung schließen. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von denen, die Jenkinson erhalten hat. Der Unterschied könnte durch folgende Gründe hervorgerufen sein:

1. Unterschiedlicher Deuterierungsgrad
2. Unterschiedliche Probenvorbereitung

Die unterschiedliche Probenvorbereitung dürfte auch bei den Versuchen zur Temperaturabhängigkeit einen Einfluß gehabt haben. Jenkinson untersuchte das Myelin bei Temperaturen zwischen -110 bis +110° C, fand jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinerlei Veränderungen im Spektrenverlauf.

Leider gibt Jenkinson nicht an, wie lange er das Myelin den höheren Temperaturen ausgesetzt hat und welcher Hydratationsgrad bei seinen Versuchsbedingungen herrschte. Denn wenn Phasenübergänge stattfinden sollen, ist ein bestimmter Feuchtigkeitsgehalt unerlässlich (109).

Als letztes soll noch auf die Zwischenstrukturen eingegangen werden, die in der Diskussion zu den Resultaten mit Myelin erwähnt werden. Smith (79) machte CD-Messungen mit dem sogenannten basischen Protein, dessen Gehalt 30 % der Proteinmenge im Myelin beträgt. Die Messungen mit dem in Deoxycholat gelösten Protein führten zu dem Ergebnis, daß das Protein neben Zufallsknäuelstruktur eine Konformation aufweist, die weder der α- noch der ß- Struktur zugeordnet werden kann. Dieses Ergebnis ist gut im Einklang mit dem der vorliegenden Arbeit; nämlich, daß eine (oder evtl. mehrere) Zwischenstruktur(en) bei den Proteinen des Myelins vorliegen müßten.

5. Messungen und Resultate mit Erythrozytenmembranen

5.1 Erläuterungen zu den Erythrozytenmembranen

Erythrozytenmembranen sind die Hüllen von kernlosen hämoglobinhaltigen Zellen (Erythrozyten oder rote Blutkörperchen), welche die Funktion des Sauerstofftransportes im Blut erfüllen (110).

Nach Entfernung des Hämoglobins aus der Zelle schließt sich die Membran wieder, scheint morphologisch unverändert und besitzt weiterhin die enzymatischen und osmotischen Eigenschaften wie beim unversehrten Erythrozyt (111).

Im Gegensatz zum Myelin ist die Erythrozytenmembran Sitz zahlreicher Enzyme. Von diesen ist vor allem die (K^+-Na^+)-abhängige ATPase zu erwähnen, die bei der Aufrechterhaltung eines ausgewogenen Gleichgewichtes von K^+, Na^+ und Wasser in der Zelle eine Rolle spielt (111).

Die Erythrozytenmembran enthält zwischen 60-70% Proteine (112), und der Cholesteringehalt beträgt ca. die Hälfte der Phospholipidmenge (113).

5.2 Untersuchungen an Erythrozytenmembranen

Die Präparation erfolgte entsprechend der auf Seite 25 erläuterten Methode. Nach einer anschließenden Zentrifugation (1 h/100 000 g) wurden die Membranen auf der Polyacrylonitrilfolie in die FMIR-Küvette gebracht. In dieser fanden die Dialysen gegen H_2O bzw. D_2O und die diversen Puffer statt (Vgl. S. 48). Bei Versuchen zur Temperaturabhängigkeit verblieb die Küvette im Spektrographen, und mittels Thermostaten wurde die gewünschte Temperatur eingestellt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte 30 Minuten nach Erreichen dieses Wertes. Handelte es sich um Messungen, in denen

Kationen- und pH-Einflüsse auf das IR-spektroskopische Verhalten der Erythrozytenmembranen untersucht wurden, so erfolgten die Messungen bei 20° C.

5.2.1 Einfluß verschiedener Ionenmilieus im pH- bzw. pD-Bereich 7,0-7,4

5.2.1.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

a) In einer Versuchsserie wurden die Erythrozytenmembranen nacheinander gegen 1. H_2O, 2. physiologische Lösung*, 3. K^+-physiologische Lösung, 4. Na^+-physiologische Lösung dialysiert. Der pH-Wert von H_2O war auf 7,0 und die pH-Werte der physiologischen Lösungen waren auf pH 7,2 eingestellt.

b) In einer weiteren Versuchserie wurden die Erythrozytenmembranen nacheinander 1. gegen H_2O und dann gegen 2. K^+-, 3. Na^+- 4. Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert. Auch in dieser Versuchsserie war H_2O auf pH 7,0 eingestellt worden.** Die Kakodylat-Puffer besaßen den pH-Wert 7,4 (Vgl. S. 47).

(ii) In D_2O

Bei den Versuchen zur Kationenabhängigkeit der deuterierten Erythrozytenmembranen wurde die Küvettenfüllung für jedes Kation erneuert. Es wurde nacheinander gegen 1. D_2O, 2. Na^+-, K^+- oder Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert. D_2O besaß den pD-Wert 7,0. Der Na^+- und Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer hatten den pD-Wert 7,4. Der K^+-Kakodylat-Puffer war auf pD 7,34 eingestellt worden.

---

*Die physiologische Lösung bestand aus 154 mMol NaCl, 5,6 mMol KCl, 2,2 mMol $CaCl_2$, 2,15 mMol Na_2HPO_4, 0,85 mMol NaH_2PO_4. Bei der K^+-physiologischen Lösung wurde NaCl durch KCl ersetzt und bei der Na^+-physiologischen Lösung fand der umgekehrte Austausch statt.

**Destilliertes Wasser, welches in üblichen Laborgefäßen aufbewahrt wird und auch mit der Luft in Berührung kommt, nimmt schnell einen niedrigeren pH-Wert als 7,0 an.

5.2.1.2 Resultate

(i) In H_2O

a) In der Versuchsserie mit den physiologischen Lösungen*

α) Mit H_2O und der physiologischen Lösung (Abb. 23a, Tab. A 3)

Die Spektren der Erythrozytenmembranen in H_2O sowie in physiologischer Lösung weisen jeweils eine Amid-I-Bande mit dem Maximum bei 1645 cm^{-1} und einer Schulter an der niederfrequenten Seite auf. Sie liegt mit H_2O bei 1635 cm^{-1} und mit der physiologischen Lösung bei 1632 cm^{-1}. Eine weitere Schulter befindet sich in beiden Spektren bei 1685 cm^{-1}. Sie ist sehr schwach ausgeprägt. Bei den gegen die physiologische Lösung dialysierten Membranen ist die Asymmetrie bei kleinen Wellenzahlen stärker ausgeprägt als bei den nur mit H_2O behandelten.

Das Absorptionsmaximum der Amid-II-Bande befindet sich in beiden Spektren bei 1542 cm^{-1}.

Die Intensitäten der CH_3-asymmetrischen-Deformations-schwingung und der bei 1435 cm^{-1} befindlichen Bande (Vgl. Tab. A 1) sind für die H_2O-Membranen intensiver als für die Membranen, die gegen physiologische Lösung dialysiert wurden.

Im H_2O-Spektrum befindet sich die Bande der CO_2^--symmetrischen-Valenzschwingung bei 1390 cm^{-1}, während sie im anderen Spektrum der Abb. 23 a bei 1395 cm^{-1} anzutreffen ist. In beiden Fällen ist sie derart verbreitert, daß die Bande der CH_3-symmetrischen-Deformationsschwingung verdeckt wird. Zwischen 1350-1260 cm^{-1} erstreckt sich jeweils eine Bande, die den (CH_2)-Nickschwingungen zuzuordnen ist (74). Im Spektrum der H_2O-Membranen besitzt sie ein bei 1310 cm^{-1} und im Spektrum der "physiologischen" Membranen ein bei 1285 cm^{-1} liegendes Maximum. Weitere Unterschiede sind im Wellenzahlenbereich 1200-1000 cm^{-1} festzustellen. So besitzen die H_2O-Membranen Banden, die sich von 1180-1137 cm^{-1}, 1137-1095 und 1095-1000 cm^{-1} erstrecken. Die letztgenannte Bande hat zwei

---

*Gemeint sind die drei physiologischen Lösungen, die auf der der vorhergehenden Seite aufgeführt werden.

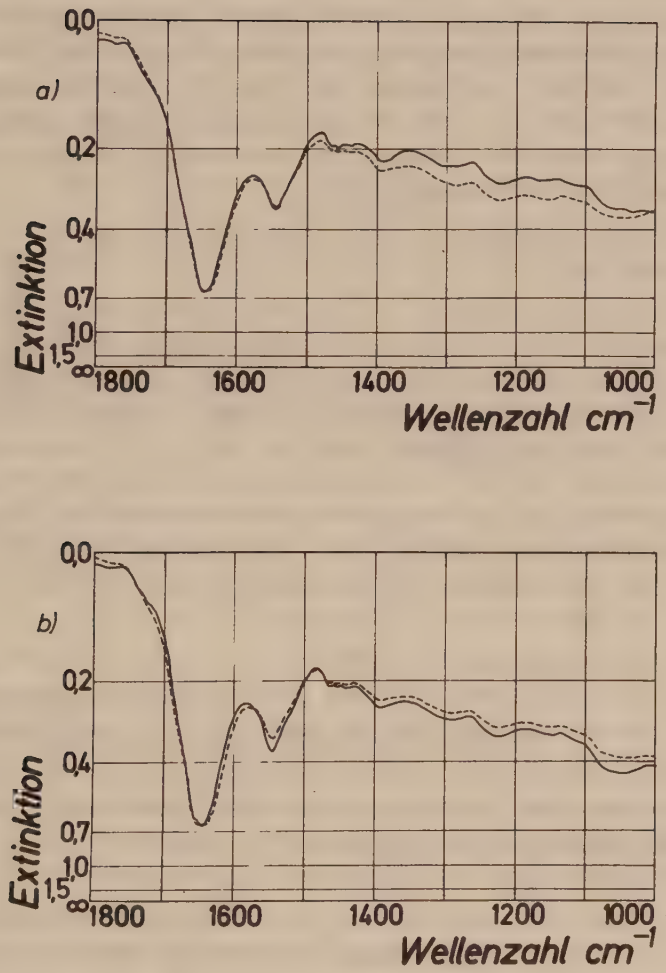


Abb. 23a: Spektren der Erythrozytenmembranen, die zunächst gegen H_2O und anschließend gegen physiologische Lösung dialysiert wurden.
—— H_2O, --- physiologische Lösung

Abb. 23b: Spektren der Erythrozytenmembranen, die anschliessend gegen 1. K^+- und 2. Na^+-physiologische Lösung dialysiert wurden.
—— Na^+, --- K^+

Absorptionsmaxima bei 1032 und 1062 cm^{-1}. Das Spektrum der Membranen, die gegen physiologische Lösung dialysiert wurden, weist Banden auf, die zwischen 1185-1132 cm^{-1} und von 1132-1000 cm^{-1} verlaufen. Die Bande im Wellenzahlenbereich 1200-1100 cm^{-1} kann der C-O-C-symmetrischen Valenz - schwingung zugeordnet werden. Bei den anderen Banden ist keine eindeutige Zuordnung möglich.

ß) Mit K^+- und Na^+-physiologischer Lösung (Abb. 23 b, Tab. A 3)

Zwischen den Spektren der Abbildungen 23 a und b bestehen beträchliche Unterschiede an der Amid-I-Bande. Für die sich in K^+-physiologischer Lösung befindlichen Membranen verläuft das Maximum zwischen 1637-1652 cm^{-1} und weist eine Unsymmetrie bei 1632 cm^{-1} auf. Das bei 1645 cm^{-1} liegende Maximum der gegen Na^+-physiologische Lösung dialysierten Erytrhozytenmembranen besitzt dagegen eine Unsymmetrie bei 1655 cm^{-1}. In beiden Spektren befindet sich eine Schulter bei 1685 cm^{-1}. (Diese ist im Spektrum der nur gegen H_2O dialysierten Membranen nur ganz schwach ausgeprägt).

Die Amid-II-Bande der Erythrozyten in Na^+- bzw. K^+-pyhsiologischer Lösung befindet sich jeweils bei 1545 cm^{-1}. Dabei besitzt die Bande in Gegenwart von Na^+-physiologischer Lösung die höhere Intensität.

Ferner besteht ein Unterschied an der Bande der CO_2^--symmetrischen-Valenzschwingung. Sie liegt mit Na^+ um 5 Wellenzahlen höher als mit K^+.

Im übrigen Wellenzahlenbereich sind bis auf die Bande, die sich zwischen 1100-1000 cm^{-1} erstreckt, keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen. Diese Bande besitzt im Spektrum der Erythrozytenmembranen, die gegen Na^+-physiologische Lösung dialysiert wurden, von allen Spektren der Abbildungen 23 a und b die höchste Intensität.

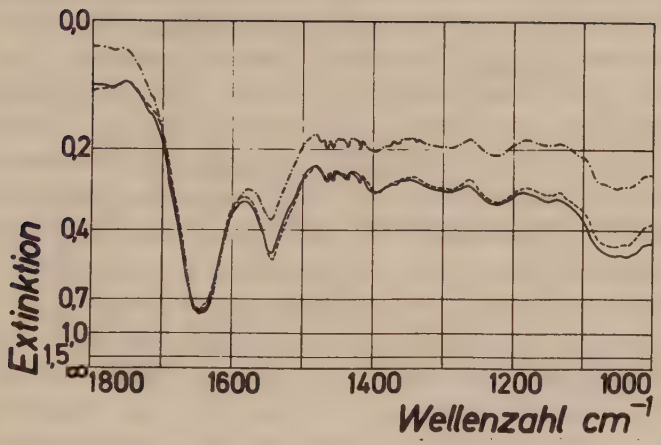


Abb. 24: Spektren von Erythrozytenmembranen, bei denen nacheinander die Dialysen gegen 1. H_2O, 2. K^+-, 3. Na^+-, 4. Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer erfolgten
—— Na^+, --- K^+, -·-·- Ca^{2+}

b) Mit den Kakodylat-Puffern (Abb. 24, Tab. A 3)

Die Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} ist in den Spektren der gegen die Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen viel intensiver als bei den Membranen, die gegen H_2O und die physiologischen Puffer dialysiert wurden. Das Maximum erstreckt sich sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ zwischen 1082-1032 cm^{-1}.

Eine Bande der CH_2-Torsionsschwingung, die sich bei 1365 cm^{-1} befindet (83), weisen nur die Spektren der Na^+- und Ca^{2+}-Membranen auf.

Für die gegen die Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen sind im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} Banden freigelegt, die in den Spektren der Abbildungen 23 a und b nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt sind. Sie liegen mit Ca^{2+} bei 1419, 1435 und 1472 cm^{-1}, mit Na^+ bei 1419 und

1435 cm^{-1} und mit K^+ bei 1416 und 1435 cm^{-1}. Die Bande bei 1419 bzw. 1416 cm^{-1} ist einer CH_2-Scherenschwingung zuzuordnen. Sie tritt bei einer α- CH_2-Gruppierung auf (87). Eine Bande bei 1435 cm^{-1} entsteht, wenn CH_2-Gruppen, die sich neben einer Doppelbindung befinden, Deformationsschwingungen ausführen (Vgl. Tab. A 1). Die bei 1472 cm^{-1} befindliche Bande kann der CH_2-Deformationsschwingung zugeordnet werden. Laut Ramachandran (88) kann die CH_2-Deformationsschwingung als Doppelbande bei 1473 und 1462 cm^{-1} auftreten.

Die Spektren der gegen die diversen Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen unterscheiden sich am stärksten im Amid-I- und Amid-II-Bandenbereich. Die bei 1545 cm^{-1} liegende Amid-II-Bande der Ca^{2+}-Membranen besitzt eine viel geringere Intensität als die Banden der Na^+- und K^+-Membranen. Von diesen wiederum ist diejenige der K^+-Membranen die intensivere. Während die Bande im Na^+-Spektrum ein Maximum bei 1542 cm^{-1} mit einer Unsymmetrie bei 1550 cm^{-1} besitzt, ist die bei 1542 cm^{-1} liegende Bande der K^+-Membranen symmetrisch.

Das Maximum der Amid-I-Bande befindet sich mit Na^+ bei 1647 cm^{-1}. Mit den beiden anderen Kationen liegt es bei 1645 cm^{-1}. In allen Fällen besitzen die Maxima starke Unsymmetrien bei 1635 cm^{-1}. Dabei nimmt die Absorptionsintensität in der Reihenfolge $K^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow Ca^{2+}$ zu und bedingt, daß die Unsymmetrie im Ca^{2+}-Spektrum am größten ist.

Aus dem Vergleich der Spektren in den Abbildungen 23 a und b sowie 24 geht hervor, daß die Amid-I-Bande der Ca^{2+}-Membranen die stärkste Verbreiterung an der niederfrequenten Seite aufweist.

Wie auch bei den Erythrozytenmembranen, deren Spektren in Abb. 23 a und b dargestellt sind, gehen auch bei den gegen die Kakodylat-Puffer dialysierten Erythrozytenmembranen die Amid-I-Banden allmählich in den Absorptionsbereich der C=O-Valenzschwingung über.

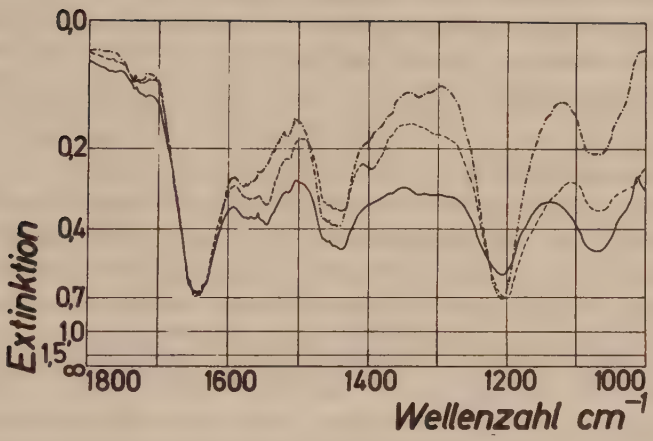


Abb 25: D_2O-Erythrozytenmembranen in Gegenwart verschiedener Kationen. Der Na^+- sowie der Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer besaßen den pD-Wert 7,4, während der K^+-Kakodylat-Puffer einen pD-Wert von 7,34 hatte.
—— Na^+, --- K^+, -·-·- Ca^{2+}

(ii) In D_2O (Abb. 25, Tab A 3)

Die Amid-I-Bande weist in Abhängigkeit von den verschiedenen Kationen sehr große Unterschiede auf. Im Falle der Na^+-Erythrozytenmembranen hat die Bande zwei Absorptionsmaxima bei 1647 und 1638 cm^{-1}. Die Maxima besitzen gleich große Intensitäten. Schultern liegen bei 1630, 1655 und 1690 cm^{-1} vor*. Da die Schultern bei 1655 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} gleich stark sind und sich auch in der Intensität kaum unterscheiden, erhält die Amid-I-Bande einen symmetrischen Verlauf.

Die Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen besitzen dagegen eine unsymmetrische Amid-I-Bande. Dies ist dadurch bedingt, daß von den beiden Absorptionsmaxima das bei 1641 cm^{-1} eine höhere Intensität als das bei 1650 cm^{-1} besitzt. Von den

*Die Schultern sind nur in den Originalspektren erkennbar.

Schultern bei 1656 und 1630 cm^{-1} besitzt die bei 1630 cm^{-1} die höhere Intensität. Dagegen ist die Schulter an der höherfrequenten Seite ausgeprägter. Eine weitere sehr schwache Schulter deutet sich bei 1687 cm^{-1} an.

Auch die Amid-I-Bande der K^+-Erythrozytenmembranen weist zwei Maxima auf. Sie befinden sich bei 1640 und 1647 cm^{-1}. Eine Schulter bei 1630 cm^{-1} ist nur sehr schwach angedeutet. Dafür ist die Schulter bei 1655 cm^{-1} sehr ausgeprägt und bedingt eine starke Unsymmetrie der Bande an der höherfrequenten Seite. Ebenso wie im Spektrum der Ca^{2+}-Membranen liegt eine sehr schwache Schulter bei 1687 cm^{-1} vor.

Die Bande der CO_2^--asymmetrischen-Valenzschwingung erstreckt sich mit Na^+ und K^+ zwischen 1556-1590 cm^{-1}. Nur im Spektrum der Ca^{2+}-Membranen weist die zwischen 1558-1592 cm^{-1} verlaufende Bande ein eindeutiges Maximum bei 1578 cm^{-1} auf.

In allen Spektren liegt eine Amid-II-Bande von Proteinen vor, an denen ein H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat. Sie befindet sich mit Na^+ bei 1545 cm^{-1} und besitzt Schultern bei 1515, 1535 und 1555 cm^{-1}. Die bei 1542 cm^{-1} befindliche Bande der K^+-Membranen weist nur eine Schulter bei 1512 cm^{-1} auf.

Im Spektrum der Na^+- und K^+-Membranen ist die Amid-II-Bande intensiver als die Bande der CO_2^--asymmetrischen-Valenzschwingung. Im Spektrum der Ca^{2+}-Membranen dagegen ist sie nur als Schulter an der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung ausgebildet. Außer dieser Schulter, die sich bei 1550 cm^{-1} befindet, liegen weitere Schultern bei 1530 und 1515 cm^{-1} vor.

Die Intensitäten der Absorptionen im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} nehmen in der Reihenfolge $Ca^{2+} \rightarrow K^+ \rightarrow Na^+$ ab. Bei den Bandenbreiten zeigt sich das umgekehrte Verhalten. Die Bande der CH_2-Deformationsschwingung befindet sich mit Na^+ sowie K^+ bei 1465 cm^{-1} und mit Ca^{2+} bei 1462 cm^{-1}.

Die in allen Spektren etwas intensivere Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung liegt jeweils bei 1458 cm^{-1}. Im weiteren Bandenverlauf steigt die Absorptionsintensität in allen Fällen weiter an, um bei 1440 cm^{-1} an stärksten zu sein. (Die Bande bei 1440 cm^{-1} wird einer CH_2-Scherenschwingung zugeordnet (83))(Siehe auch Tab. A 1).

Eine Bande der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung ist nur im Spektrum der K^+-Erythrozytenmembranen ausgebildet. Statt dessen befindet sich in den Spektren der Ca^{2+}- und Na^+-Membranen eine Bande bei 1330 cm^{-1}. Sie tritt mit den Ca^{2+}-Ionen weit deutlicher hervor. Der Vergleich mit den Spektren, die zur pD-Abhängigkeit aufgenommen wurden, macht folgendes Bandenverhalten deutlich:

> Wenn die Intensität der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung mit geringer werdendem pD-Wert abnimmt, erhöht sich die Intensität einer Bande um 1330 cm^{-1}.

Sie dürfte nach Hadži et al. (131) auf eine der Banden zurückzuführen sein, die durch Kopplung der OD-Deformationsschwingung mit der C-O-Valenzschwingung entstehen. Neueren Erkenntnissen zufolge (132) müßte es sich um die Bande der C-O-Valenzschwingung dieser beiden Banden handeln.

Das Spektrum der Ca^{2+}-Membranen unterscheidet sich von den beiden anderen Spektren auch durch das Vorhandensein einer Schulter bei 1382 cm^{-1}. Sie dürfte der CH_3-symmetrischen-Deformationsschwingung zuzuordnen sein.
Allen Spektren gemeinsam ist wiederum eine Schulter der CH_2-Torsionsschwingung bei 1365 cm^{-1} (83).

Die Bande der D_2O-Scherenschwingung, die mit Na^+ sowie mit Ca^{2+} bei 1206 cm^{-1} und mit K^+ bei 1200 cm^{-1} liegt, erstreckt sich zwischen 1200-1100 cm^{-1}. Dadurch verdeckt sie die Banden der P=O-Valenzschwingung und der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung.

An der Bande des Wellenzahlenbereichs 1100-1000 cm^{-1} bestehen Unterschiede in der Breite der Absorptionsmaxima. Sie erstreckt sich mit Na^+ zwischen 1082-1057 cm^{-1}, mit K^+

zwischen 1077-1054 cm^{-1} und mit Ca^{2+} zwischen 1082-1062 cm^{-1}. Die Absorptionsintensitäten nehmen in der Reihenfolge $Ca^{2+} \rightarrow Na^{+} \rightarrow K^{+}$ ab.

5.2.2 Temperaturabhängigkeit

5.2.2.1 Durchgeführte Meßreihen

An hydratisierten Erythrozytenmembranen wurde der Einfluß der Temperatur bei den Werten 10°, 20° und 30° Celsius untersucht. Es wurde stets mit 10°C begonnen und über 20° nach 30° C gegangen. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurde 30 Minuten später mit der Aufnahme der Spektren begonnen. Für die Versuche mit physiologischer Lösung und den Kakodylat-Puffern wurden verschiedene Küvettenfüllungen verwendet. Die Dialysen gegen die Kakodylat-Puffer erfolgten in der Reihenfolge, wie im Abschnitt 5.2.1.1, Seite 79 angegeben.

5.2.2.2 Resultate (Abb. 26a-d, Tab. 7)

In den Abbildungen 26 a – d sind die Spektren nur im Wellenzahlenbereich 1800-1550 cm^{-1} dargestellt, weil im übrigen Spektralbereich keine wesentlichen Veränderungen in Abhängigkeit von der Temperaturvariation im Intervall von 10°-30° C festzustellen waren.

a) Mit physiologischer Lösung (Abb. 26 a, Tab. 7)

Bei den sich in physiologischer Lösung befindlichen Erythrozytenmembranen verschiebt sich beim Erwärmen auf 20° C die vorher bei 1636 cm^{-1} liegende Schulter nach 1632 cm^{-1}. Die Absorption bei dieser Wellenzahl nimmt in dem Maße zu, daß sich das Maximum nun zwischen 1645-1632 cm^{-1} erstreckt. Da die Absorption bei 1652 cm^{-1} unverändert bleibt, erhält die Bande an der niederfrequenten Seite eine starke Unsymmetrie. Nach dem Erwärmen auf 30° C erhöht sich nochmals die Absorptionsintensität bei 1632 cm^{-1}.

Kation / Temperatur °C	Wellenzahl cm^{-1} *	Na^+	K^+	Ca^{2+}
10	1645 s 1652 sh 1636 sh	1645 s 1635 sh 1652 sh	1645 s 1652 sh 1635 sh	1645 s 1655 sh 1635 sh
20	1645 s 1632 s 1652 sh	1647 s 1635 sh 1652 sh	1645 s 1652 sh 1635 sh	1645 s 1635 sh 1655 sh 1630 sh
30	1645 s 1632 s 1652 sh	1647 s 1652 sh 1635 sh	1645 s 1652 sh 1635 sh	1645 s 1635 sh 1655 sh 1630 sh

Tab. 7: Absorptionen der Amid-I-Schwingungen in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen. Die Erythrozytenmembranen waren gegen physiologische Lösung bzw. gegen Na^+-, K^+-, Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert worden.
Bemerkungen: * Es handelt sich um die physiologische Lösung.

b) Mit Na^+ (Abb. 25 b, Tab. 7)

Im Spektrum der Na^+-Erythrozytenmembranen nimmt durch die Temperaturerhöhung die Intensität der Amid-I-Bande zu. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Temperaturerhöhung von 10° auf 20° C von 1645 nach 1647 cm^{-1}. Hier ist das Maximum auch bei 30° C anzutreffen.

c) Mit K^+ (Abb. 25 c, Tab. 7)

Im Spektrum der K^+-Membranen erhöht sich beim Übergang von 10° auf 20° C die Intensität der Schulter bei 1635 cm^{-1},

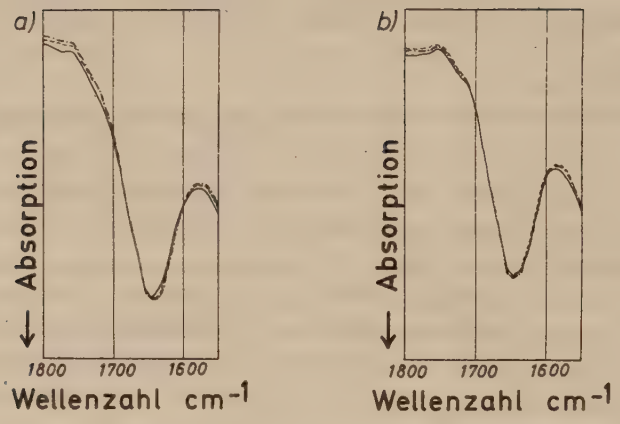


Abb. 26a: Temperaturabhängigkeit der gegen physiologische Lösung dialysierten Erythrozytenmembranen
Abb. 26b: Temperaturabhängigkeit der gegen Na^+-Kakodylat-Puffer dialysierten Erythrozytenmembranen
Für beide Abbildungen gilt: —— 10° C, --- 20° C, -·-·- 30° C.

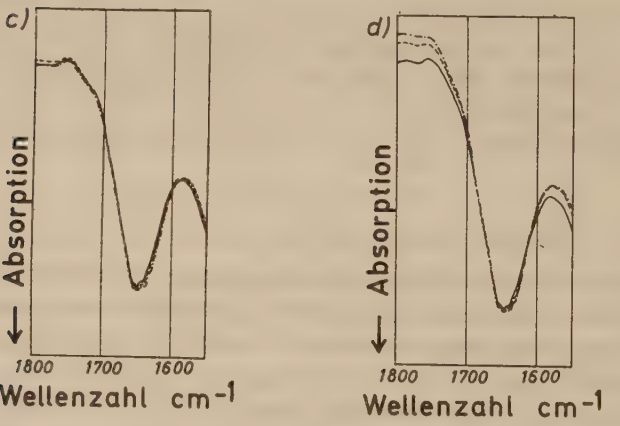


Abb. 26c: Temperaturabhängigkeit der gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysierten Erythrozytenmembranen
Abb. 26d: Temperaturabhängigkeit der gegen Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysierten Erythrozytenmembranen
Für beide Abbildungen gilt: —— 10° C, --- 20° C, -·-·- 30° C.

Bei 30° C ist die Absorptionsintensität bei 1635 cm^{-1} stärker als bei 1652 cm^{-1}.

d) Mit Ca^{2+} (Abb. 26 d, Tab 7)

Die Temperaturerhöhungen bewirken bei den Ca^{2+}-Membranen die stärksten Veränderungen. Bei 20° C bilden sich zwei sehr schwache Schultern bei 1690 und 1630 cm^{-1} aus. Bei 30° C erhöht sich sowohl die Absorption bei 1630 cm^{-1} als auch diejenige bei 1635 cm^{-1}. Hierdurch verstärkt sich die bereits bei 20° C vorhandene Unsymmetrie an der niederfrequenten Seite. Während bei 10° C die Absorptionen bei 1655 und 1635 cm^{-1} gleich stark sind, bewirkt die Temperaturerhöhung auf 30° C, daß die Absorption an der niederfrequenten intensiver als an der höherfrequenten Seite ist.

5.2.3 pH- und pD-Abhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen

Für die Untersuchung der pH- bzw. pD-Abhängigkeit der Erythrozytenmembranen wurde der pH- bzw. pD-Wert* ausgehend von 7,4 stufenweise mittels Na^+-, K^+ oder Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer erniedrigt. Die in fast allen Fällen erfolgende Wiedereinstellung des physiologischen pH- bzw. pD-Wertes sollte die Frage klären, ob die festzustellenden Veränderungen reversibel sind. Für jede Meßserie wurde das Material in der Küvette erneuert. Nach Beendigung einer Dialyse wurden stets der pH- bzw. pD-Wert der zuletzt ausgepumpten Dialyseflüssigkeit bestimmt.

5.2.3.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

Der Tabelle 8 ist zu entnehmen, welche pH-Werte an den Na^+- und K^+-Membranen eingestellt wurden. Ferner ist daraus zu ersehen, um die wievielte Dialyse der Serie es sich handelte.

---

*Die pD-Werte wurden an einem pH-Meter abgelesen.

Kation / Nummer	pH-Werte		pD-Werte		
	K^+	Na^+	K^+	Na^+	Ca^{2+}
1	7,4	7,4	7,34	7,4	7,4
2	6,4	6,4	3,46	3,5	4,0
3	5,4	5,4	3,1	3,0	3,04
4	4,42	4,4	4,06	2,5	2,0
5	4,04	4,06	7,4	2,0	6,34
6	3,5	3,54	--	7,4	--
7	3,04	3,08	--	--	--
8	2,56	2,54	--	--	--
9	7,4	7,4	--	--	--

Tab. 8: Zusammenstellung von den pH- und pD-Werten der Kakodylatpuffer, gegen welche die Erythrozytenmembranen dialysiert wurden. Die Nummer gibt an, um die wievielte Dialyse es sich bei einer Meßreihe handelte.

(ii) In D_2O

In der Tabelle 8 sind die pD-Werte der Kakodylat-Puffer, gegen welche die Erythrozytenmembranen dialysiert worden sind, aufgeführt. Die Konzentrationen der Na^+- und K^+-Kakodylat-Puffer entsprachen denen, die in Abschnitt 2.7.1.2 aufgeführt sind und bei allen Versuchen verwendet wurden. Die Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer enhielten statt 50 mMol nur 25 mMol $CaCl_2$ (Vgl. S. 47).

5.2.3.2 Resultate

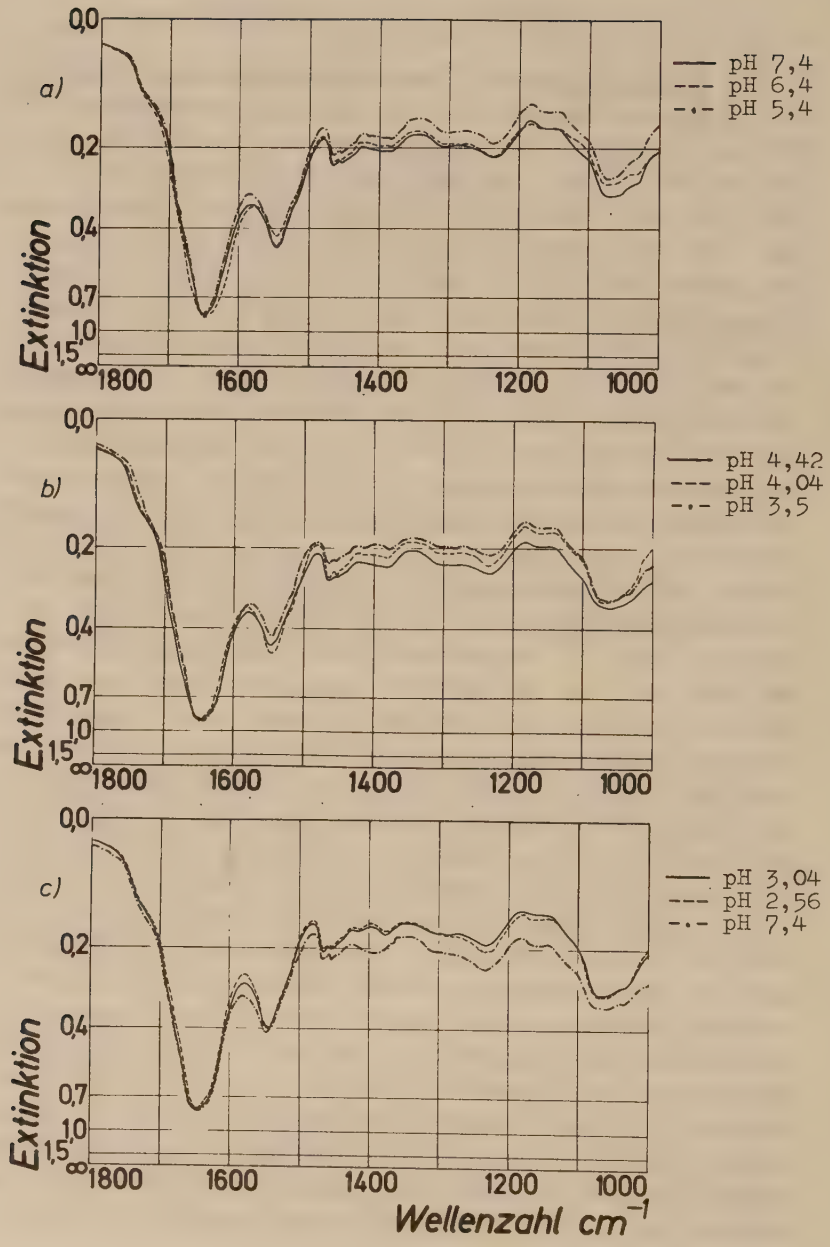
(i) In H_2O

Bei der Variation der pH-Werte an den K^+- und Na^+-Erythrozytenmembranen zeigen die Spektren die größten Änderungen im Amid-I- und Amid-II-Bandenbereich sowie im Wellenzahlenbereich 1375-1415 cm^{-1} mit K^+ bzw. 1380-1395 cm^{-1} mit Na^+.

a) Mit K^+ (Abb. 27 a-d, Tab. A 4)

Die Amid-I-Bande der K^+-Erythrozytenmembranen besitzt bei pH 7,4 ein Maximum bei 1647 cm^{-1} und Schultern bei 1635 und 1655 cm^{-1}. Bei pH 6,4 kommt es zu einer Bandenverbreiterung, die mit der Ausbildung einer Schulter bei 1690 cm^{-1} und einer Verschiebung der 1655 cm^{-1} Unsymmetrie nach 1657 cm^{-1} verbunden ist. Gleichzeitig werden die Absorptionen bei 1635 und 1657 cm^{-1} gleich stark. Bei dem pH-Wert 5,4 verschiebt sich das Maximum der wieder schmäleren Bande nach 1650 cm^{-1}, und es verschwindet die Schulter bei 1647 cm^{-1}. An der Schulter bei 1635 cm^{-1} verändert sich bei diesem pH-Wert nichts. Nach weiterer Erniedrigung des pH-Wertes auf nun 4,42 ist die Amid-I-Bande generell gegenüber derjenigen bei pH 7,4 verbreitert, und zwar ist die Verbreiterung bei kleinen Wellenzahlen stärker. Insgesamt aber ist die Bande mit einem nun bei 1645 cm^{-1} liegenden Maximum symmetrisch.* Bei pH 4,04 befindet sich das Maximum wiederum bei 1647 cm^{-1} und weist Unsymmetrien bei 1632 und 1655 cm^{-1} auf. Ferner zeigt sich nun eine Schulter bei 1690 cm^{-1}, wo sie auch bei pH 3,5 vorliegt. Bei diesem pH-Wert verstärkt sich die Absorptionsintensität an der niederfrequenten Seite. Gleichzeitig ist eine starke Bandenverschmälerung - die bei pH 3,04 noch deutlicher wird - an der höherfrequenten Seite zu beobachten. Sowohl bei pH 3,5 als auch 3,04 liegen Schultern nur bei 1655 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} vor. Bei pH 2,56 verschwindet die Schulter bei 1655 cm^{-1}. Statt dessen bildet sich eine starke Unsymmetrie bei 1635 cm^{-1} aus. Die erneute Dialyse gegen den pH 7,4-Puffer bewirkt eine Abschwächung dieser Unsymmetrie, die gleichzeitige Ausbildung einer Schulter bei 1655 cm^{-1} sowie die Verschiebung des Maximums auf 1645 cm^{-1}. Somit besitzt die Bande nicht das Maximum wie nach der ersten Dialyse gegen den pH-7,4-Puffer. Außerdem zeigt ein Vergleich der beiden Banden, daß die Bande nach der Rückdialyse gegen den pH 7,4-Puffer stark an der niederfrequenten Seite verbreitert ist. Zudem weist sie eine schwache Schulter bei 1680 cm^{-1} auf (Siehe Abb. 27 d).

*Die Symmetrie impliziert, daß die Schulter bei 1690 cm^{-1} verschwunden ist.



Abbildungen 27a-c: pH-Abhängigkeit der K^+-Erythrozyten-membranen

Was die Amid-II-Bande anbetrifft, so besitzt sie bei den pH-Werten 7,4, 6,4 und 5,4 ein Maximum bei 1545 cm^{-1} und eine Schulter bei 1515 cm^{-1}. Bei pH 4,42 ist die Bande nach 1547 cm^{-1} verschoben. Bei pH 4,04 bildet sich eine Schulter bei 1565 cm^{-1} an der nun bei 1546 cm^{-1} liegenden Bande aus. Bei pH 3,5 ist sie wieder verschwunden. Bei pH 3,04 und 2,56 befindet sich das Maximum der Bande bei 1542 cm^{-1}. Schultern liegen bei 1515 und 1547 cm^{-1} vor. Nach der Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer wandert das Maximum nach 1547 cm^{-1}. Es liegt nur noch eine Schulter bei 1515 cm^{-1} vor.

Bei pH 7,4 zeigt sich im Wellenzahlenbereich 1420-1360 cm^{-1} eine unsymmetrische Bande. Sie ist durch die Überlagerung mehrerer Banden, die sich in diesem Wellenbereich befinden, entstanden (Vgl. Tab. A 1).

Bei pH 7,4 befindet sich ein schwach ausgeprägtes Maximum bei 1382 cm^{-1}. Dessen Intensität erhöht sich bei pH 6,4 ein wenig, relativ zur Bandenintensität bei 1395 cm^{-1}. Den gleichen Bandenverlauf kann man bei pH 5,4 beobachten. Bei pH 4,42 verschiebt sich das Maximum nach 1380 cm^{-1}, wo es auch bei pH 4,04 verbleibt. Die Erniedrigung des pH-Wertes auf 3,5 hat eine starke Verminderung der Absorption bei 1395 cm^{-1} zur Folge. Dabei wird eine schwache Bande bei

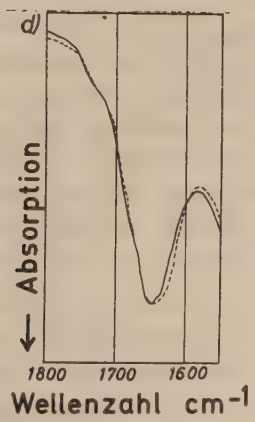


Abb. 27d: K^+-Erythrozytenmembranen vor und nach der pH-Wert-Erniedrigung
—— davor, --- danach

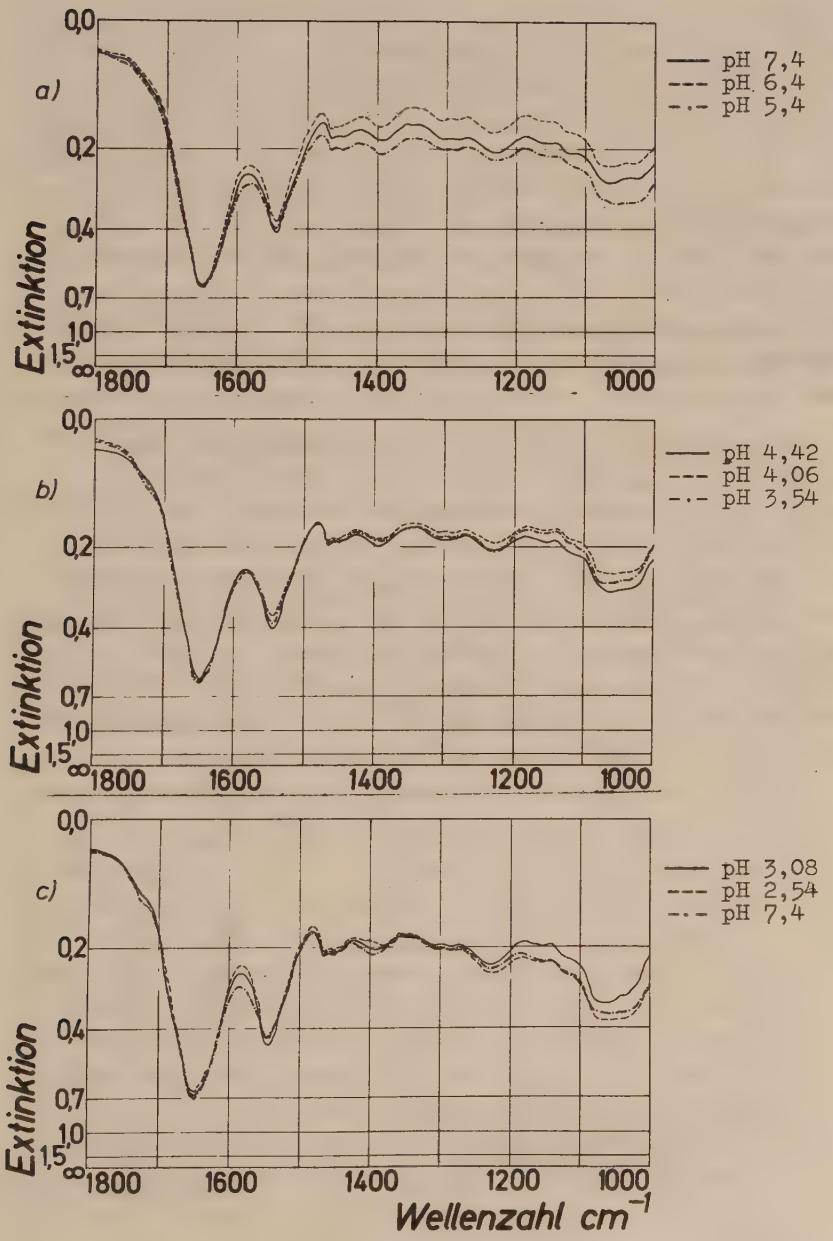
1415 cm^{-1} freigelegt. Bei pH 3,04 tritt diese Bande noch mehr hervor. Bei den niedrigsten pH-Werten (3,04 und 2,56) hat die Absorption bei 1395 cm^{-1} die geringste Intensität erreicht. Das zuvor bei 1380 cm^{-1} befindliche Maximum ist nun bei 1375 cm^{-1} anzutreffen, während sich an der Lage der Bande bei 1415 cm^{-1} nichts verändert hat.

Die pH-abhängigen Veränderungen an der Bande zwischen 1420-1360 cm^{-1} sind nicht vollständig reversibel. Nach der Rückdialyse gegen den pH 7,4-Puffer weist die Bande des eben erwähnten Wellenzahlenbereichs einen nahezu symmetrischen Verlauf mit einem verbreiterten Maximum um 1390 cm^{-1} auf. Eine schwache Schulter ist bei 1365 cm^{-1} angedeutet (Vgl. Abb. 27 d).

b) Mit Na^+ (Abb. 28 a-d, Tab. A 4)

An der Bande des Wellenzahlenbereichs 1420-1362 cm^{-1} zeigen die Na^+-Erythrozytenmembranen ein von den K^+-Erythrozytenmembranen unterschiedliches pH-abhängiges Verhalten. Bei pH 7,4 verläuft die Bande, welche ein Maximum bei 1395 cm^{-1} besitzt, fast symmetrisch. Bis einschließlich pH 4,06 sind an der Bande keine Änderungen festzustellen. Bei pH 4,06 verschiebt sich dann die Bande bei gleichzeitig geringfügiger Intensitätsverminderung nach 1392 cm^{-1}. Bei pH 3,54 und 3,08 liegt die nun noch weniger intensive Bande bei 1387 cm^{-1}. Bei pH 2,54 hat sich die Bande nach 1380 cm^{-1} verschoben und besitzt die geringste Intensität im Vergleich zu den anderen Banden dieses Wellenzahlenbereichs, die von den Na^+-Erythrozytenmembranen zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit aufgenommen wurden. Eine Bande bei 1415 cm^{-1}, die im Spektrum der K^+-Erythrozytenmembranen ab pH 3,5 auftritt, ist in keinem der Na^+-Spektren zu beobachten.

Die Amid-II-Bande der Na^+-Erythrozytenmembranen besitzt bei allen pH-Werten (Vgl. Tab. 8) das Maximum bei 1545 cm^{-1}. Bei der Erniedrigung der pH-Werte bis pH 3,54 verliert die Bande an Intensität. Bei weiterer Erniedrigung der pH-Werte



Abbildungen 28a-c: pH-Abhängigkeit der Na^+-Erythrozytenmembranen

nimmt die Intensität wieder zu. Sie wird zuletzt sogar größer als im Spektrum der Membranen bei pH 7,4 (1. Dialyse). Nach der Rückdialyse gegen den pH 7,4-Puffer erhält die Bande wieder die ursprüngliche Intensität. Eine Schulter bei 1515 cm^{-1} bildet sich erst bei pH 4,4 aus und liegt bei allen niedrigeren pH-Werten vor. Eine weitere Schulter bildet sich nach der Erniedrigung auf pH 2,54 bei 1565 cm^{-1} aus. Nach der Rückdialyse gegen den pH 7,4-Puffer verschwinden beide Schultern.
Bei allen pH-Werten ist die Amid-II-Bande der Na^+-Erythrozytenmembranen intensiver als die der K^+-Erythrozytenmembranen.

Auch die Amid-I-Bande der Na^+-Erythrozytenmembranen zeigt ein von der Amid-I-Bande der K^+-Erythrozytenmembranen differierendes pH-abhängiges Verhalten. Bei pH 7,4 besitzt die Bande ein Maximum bei 1647 cm^{-1} und Schultern bei 1637 und 1655 cm^{-1}. Dabei ist die Absorptionsintensität bei 1655 cm^{-1} höher als bei 1637 cm^{-1}. Bei den pH-Werten 6,4 und 5,4 zeigt sich eine zusätzliche Schulter bei 1680 cm^{-1}. Die Verringerung des pH-Wertes auf 4,4 hat eine Verminderung der Schulter bei 1655 cm^{-1} zur Folge. Gleichzeitig vergrössert sich die Unsymmetrie der Bande bei 1635 cm^{-1}.

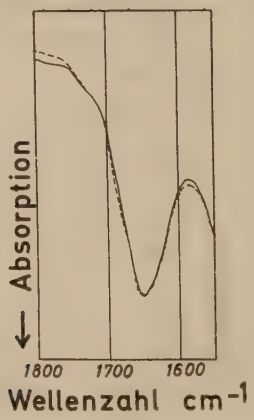


Abb. 28 d: Na^+-Erythrozytenmembranen vor und nach der pH-Wert-Erniedrigung.
—— davor, --- danach

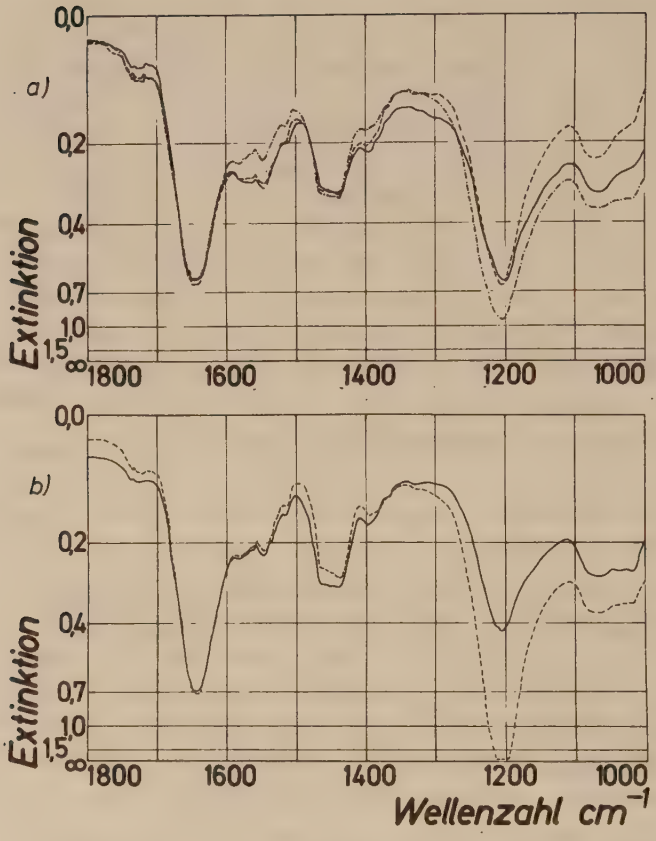
Bei pH 4,06 und 3,54 ändert sich nichts an der Unsymmetrie. Die Absorption bei 1655 cm^{-1} im Vergleich zu der bei 1635 cm^{-1} ist jedoch intensiver geworden. Nach Erniedrigung des pH-Wertes auf 3,08 verändert sich der Bandenverlauf dahingehend, daß sich die an der niederfrequenten Seite befindliche Schulter nach 1637 cm^{-1} verschiebt. Gleichzeitig bildet sich eine Schulter bei 1685 cm^{-1} aus. Bei pH 2,54 weist die nun bei 1647 cm^{-1} liegende Bande Schultern bei 1654, 1630 und 1680 cm^{-1} auf. Die Bande ist nun an der niederfrequenten Seite unsymmetrischer als an der höherfrequenten Seite. Der Verlauf des Spektrums nach der Erhöhung des pH-Wertes auf 7,4 beweist, daß in Gegenwart tenmembranen reversibel sind (Abb. 28 d) (bezüglich des Maximums und des Verlaufs an der niederfrequenten Seite).

(ii) In D_2O (Tab. A 5)

a) Mit K^+ (Abb 29a-29c)

Bei der Erniedrigung des pD-Wertes von 7,34 auf 3,46 nimmt die Intensität der Bande der C=O-Valenzschwingung stark zu. Bei pD 3,1 ändert sie sich nicht mehr. Die Erhöhung des pD-Wertes auf 4,06 bewirkt eine geringe Intensitätsabnahme und der Verlauf der Bande nach der Rückdialyse gegen den pD 7,34-Kakodylat-Puffer beweist, daß die Intensitätszunahme voll reversibel ist (Vgl. Abb. 29 c).

An der Amid-I-Bande treten weit größere Veränderungen in Abhängigkeit von der Erniedrigung der pD-Werte auf. Bei pD 7,34 besitzt die Bande ein Maximum bei 1647 cm^{-1}. Bei 1637 und 1655 cm^{-1} liegen starke Schultern vor. Bei pD 3,46 kommt es zu einer Bandenaufspaltung. Die beiden Maxima befinden sich bei 1647 und 1640 cm^{-1}. Bei 1632 cm^{-1} zeigt sich eine Unsymmetrie. Die Absorptionsintensität bei dieser Wellenzahl ist geringer als bei 1655 cm^{-1}. Bei pD 3,1 sind die Absorptionsintensitäten bei diesen Wellenzahlen gleich groß. Als wichtige Veränderung bei diesem pD-Wert ist die Ausbildung einer Schulter bei 1685 cm^{-1} zu nennen. Bei pD 4,06 liegt diese Schulter



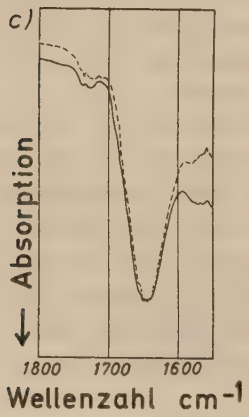


Abb. 29a: pD-Abhängigkeit der K^+-Erythrozytenmembranen
—— pD 7,34, --- pD 3,46
-.-.- pD 3,1

Abb. 29b: pD-Abhängigkeit der K^+-Erythrozytenmembranen
—— pD 4,06, --- pD 7,4

Abb. 29c: K^+-Erythrozytenmembranen bei pD 7,34 vor und nach der pD-Wert-Erniedrigung
—— davor, --- danach

weiterhin vor. Das Maximum verläuft nun zwischen 1640-1650 cm^{-1}. Außerdem ist die Bande beidseitig verschmälert. Diese Verschmälerung ist mit einer Verminderung der Schultern bei 1655 und 1632 cm^{-1} verbunden. Die Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer bewirkt, daß die Absorptionsintensität bei 1640 höher als bei 1650 cm^{-1} wird. Der Vergleich der Spektren, die bei pD 7,34 vor und nach der Erniedrigung der pD-Werte aufgenommen wurden, macht deutlich, daß die an der Amid-I-Bande stattgefundenen Veränderungen irreversibel sind (Vgl. Abb. 29 c).

Irreversible Veränderungen finden ebenfalls an der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung statt. Die Bande erstreckt sich bei pD 7,34 zwischen 1556-1582 cm^{-1}. Nach Erniedrigung auf pD 3,46 wird eine Absorption bei 1575 cm^{-1} deutlich intensiver als im übrigen Bereich dieser Bande. Das Maximum verschiebt sich bei pD 3,1 nach 1582 cm^{-1}, und die Bande tritt deutlicher hervor. Die Erhöhung des pD-Wertes auf 4,06 bewirkt keine Änderung. Bei pD 7,34 verschiebt sich die in ihrer Intensität unveränderte Bande lediglich nach 1580 cm^{-1}.

Die Amid-II-Bande von Proteinen, an denen der H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat, besitzt bei pD 7,34 ein Maximum bei 1542 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1512 cm^{-1}. Nach der Erniedrigung auf pD 3,46 sind Schulter bzw. Maximum nach 1545 bzw. 1515 cm^{-1} verschoben. Nach der Dialyse gegen den pD 3,1-Puffer bildet sich eine sehr schwache Schulter bei 1535 cm^{-1}, die nach der Erhöhung des pD-Wertes auf 4,06 kräftiger wird. Nach der Dialyse gegen den pD 7,4-Puffer verschieben sich das Maximum sowie die Schultern um 2 cm^{-1} zu kleinen Wellenzahlen.

Im Wellenzahlenbereich 1400-1500 cm^{-1} bewirkt die pD-Erniedrigung auf 3,46 eine Verschiebung der Absorptionsbande zu großen Wellenzahlen. Gleichzeitig ist eine Intensitätszunahme zu beobachten. Bei pD 3,1 wird die Bande bei kleinen Wellenzahlen schmäler, und die Intensität nimmt weiter zu. Die Erhöhung des pD-Wertes auf 4,06 hat keine Veränderung im Bandenverlauf zur Folge. Nach der Rückdia-

lyse gegen den pD 7,34-Puffer kehrt die Bande wieder in die Lage zurück, die sie vor der Erniedrigung der pD-Werte hatte, behält aber die Intensität wie bei pD 3,1.

Das Maximum bei 1395 cm^{-1} der Bande der CO_2-symmetrischen Valenzschwingung verschiebt sich nach Erniedrigung des pD-Wertes von 7,34 auf 3,46 nach 1397 cm^{-1}. Die vorher bei 1378 cm^{-1} befindliche Schulter ist dann bei 1380 cm^{-1} anzutreffen und wird etwas kräftiger. Gleichzeitig tritt auch die unverändert bei 1367 cm^{-1} liegende Bande der CH_2-Torsionsschwingung (83) stärker hervor. Die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,1 hat eine Verminderung der Absorption bei 1397 cm^{-1} zur Folge. Bei pD 4,06 besitzt die sich noch bei 1397 cm^{-1} befindliche Bande der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung wieder die gleiche Intensität wie bei pD 7,34 vor der Erniedrigung der pD-Werte. Nach der Rückdialyse gegen den pD 7,34-Puffer liegt das Maximum wieder bei 1395 cm^{-1}.

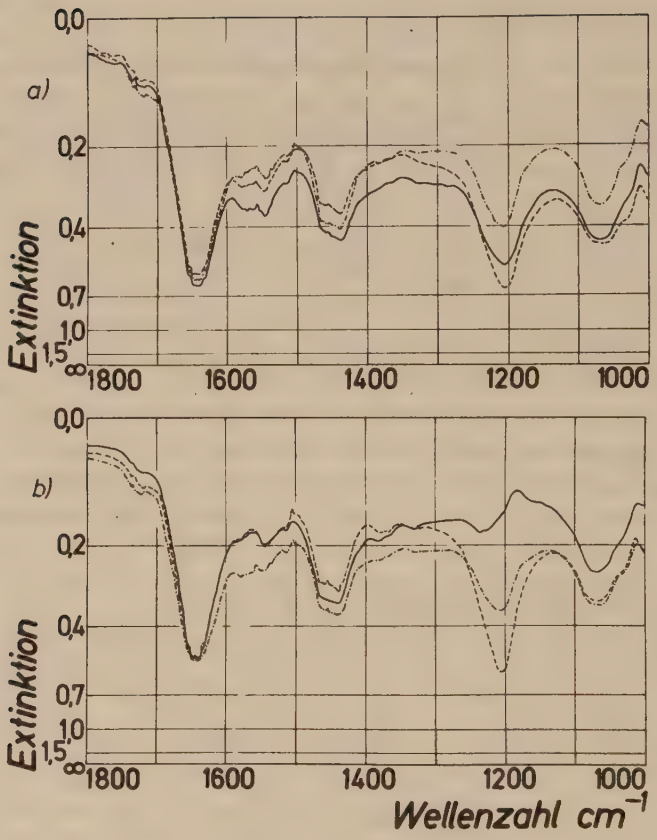
Auch an der Bande der D_2O-Scherenschwingung zeigt sich eine pD-abhängige Veränderung. Nach der Erniedrigung des pD-Wertes von 7,34 auf 3,46 befindet sich die vorher bei 1200 cm^{-1} liegende Bande bei 1205 cm^{-1}. Eine Verschiebung auf 1206 cm^{-1} resultiert aus der nächsten pD-Wert-Erniedrigung. Bei pD 4,06 befindet sich das Maximum wieder bei 1205 cm^{-1}. Nach der Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer gelang es nicht, die Bande der D_2O-Scherenschwingung ausreichend zu kompensieren. Daher kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die pD-abhängige Verschiebung der D_2O-Bande reversibel ist.

An der Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} wird die bei 1015 cm^{-1} liegende Schulter durch die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,46 etwas kräftiger. Bei pD 3,06 ist eine weitere Intensitätszunahme zu beobachten. Die Spektren, die nach der Wiedererhöhung der pD-Werte auf zunächst 4,06 und dann 7,34 aufgenommen wurden, zeigen, daß die Intensitätsveränderung irreversibel ist.

b) Mit Na^+ (Abb. 30a-c)

Die Bande der C=O-Valenzschwingung gewinnt bei der pD-Wert-Erniedrigung von 7,4 auf 3,5 und dann 3,0 jeweils an Intensität. Bei der Erniedrigung auf pD 2,5 erfolgt dann eine starke Intensitätsabnahme. Weitere Erniedrigung des pD-Wertes auf 2,0 läßt die Intensität wieder ansteigen. Nach der Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer tritt keine Änderung mehr ein. Der Vergleich der Spektren, die von den Na^+-Membranen bei pD 7,4 vor und nach der Erniedrigung der pD-Werte aufgenommen wurden, zeigt, daß die C=O-Bande in beiden Fällen die gleiche Intensität besitzt.

Die Amid-I-Bande verändert sich bei Übergang von pD 7,4 auf 3,5 dahingehend, daß das Maximum bei 1647 cm^{-1} seine Lage beibehält. Ein vorher bei 1638 cm^{-1} liegendes Maximum verschiebt sich um 3 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Während die Schulter bei 1630 cm^{-1} verschwindet und die bei 1685 cm^{-1} geringfügig abnimmt, verändert sich die Unsymmetrie bei 1655 cm^{-1} nicht. Hierdurch wird die Bande bei großen Wellenzahlen unsymmetrisch . Nach Herabsetzung des pD-Wertes auf 3,0 erhält das Maximum bei 1641 cm^{-1} wieder eine Unsymmetrie bei 1630 cm^{-1}. Die Schulter bei 1655 cm^{-1} verschiebt sich nach 1652 cm^{-1}. Da die Absorption bei 1652 cm^{-1} intensiver als bei 1630 cm^{-1} wird, gewinnt die Bande eine noch stärkere Unsymmetrie bei hohen Wellenzahlen. Bei dem Wert pD 2,5 ist die Bande nicht mehr aufgespalten. Das Maximum ist verbreitert und erstreckt sich zwischen 1640-1650 cm^{-1}. Die Schultern bei 1685 und 1630 cm^{-1} verschwinden, und diejenige bei 1655 cm^{-1} wird ausgeprägter. Gleichzeitig verschmälert sich die Bande an der niederfrequenten stärker als an der höherfrequenten Seite. Beim Übergang auf pD 2,0 ist die Bande wieder aufgespalten. Es zeigen sich zwei Maxima bei 1648 und 1641 cm^{-1}. Gleichzeitig entsteht wieder eine Schulter bei 1630 cm^{-1}. Sie besitzt eine weit geringere Intensität als die Absorption bei 1655 cm^{-1}. Nach der Rückdialyse der Erythrozytenmembranen gegen den pD 7,4-Puffer verbreitert sich die Bande, ohne daß sich an den Maxima oder Schultern etwas ändert. Abb. 30 c zeigt, daß



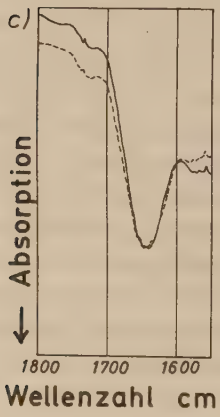


Abb. 30a: pD-Abhängigkeit der Na^+-Erythrozytenmembranen
—— pD 7,4, --- pD 3,5
-·-·- pD 3,0

Abb. 30b: pD-Abhängigkeit der Na^+-Erythrozytenmembranen
—— pD 2,5, --- pD 2,0
-·-·- pD 7,4 (Rückdialyse)

Abb. 30c: Na^+-Erythrozytenmembranen bei pD 7,4 vor und nach der pD-Wert-Erniedrigung
—— davor, --- danach

die Amid-I-Banden der Erythrozytenmembranen vor und nach der pD-Wert-Erniedrigung einen recht unterschiedlichen Verlauf aufweisen. Vor der pD-Wert-Erniedrigung befinden sich die Maxima bei 1638 cm^{-1} und 1647 cm^{-1}. Nach der pD-Wert-Erniedrigung ist eine Verschiebung der Maxima nach 1645 und 1650 cm^{-1} festzustellen. Außerdem ist die Bande nach der pD-Wert-Erniedrigung gegenüber der Bande vor der pD-Wert-Erniedrigung zwischen 1635 und 1640 cm^{-1} verschmälert und an der höherfrequenten Seite stark verbreitert.

Im Wellenzahlenbereich 1500-1600 cm^{-1} finden sowohl an der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung als auch an der Amid-II-Bande der Proteine mit keinem oder nur unvollkommenem H_2O-D_2O Austausch Veränderungen bei der pD-Wert-Erniedrigung statt. Bei pD 7,4 erstreckt sich das Maximum der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung zwischen 1557-1580 cm^{-1}. Bei pD 3,5 verringert sich die Absorption bei 1557 cm^{-1} ein wenig und bei pD 3,0 etwas stärker. Dadurch zeigt sich zunächst ein schwach ausgeprägtes Maximum bei 1580 cm^{-1}. Bei pD 3,0 tritt das Maximum dann deutlich hervor. Die Erniedrigung des pD-Wertes auf 2,5 führt zu einer Verschiebung des Maximums nach 1678 cm^{-1}. Sie ist mit einer Abnahme der Intensität verbunden. Nach der Dialyse gegen den pD 2,0-Puffer bleibt das Spektrum in diesem Wellenzahlenbereich unverändert. Die Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer bewirkt zwar, daß die Absorption zwischen 1557 cm^{-1} und dem Maximum bei 1580 cm^{-1} wieder zunimmt; die Bande wird jedoch nicht mehr so intensiv, wie es vor der Erniedrigung des pD-Wertes der Fall war. Insbesondere die Absorptionsintensität bei 1560 cm^{-1} bleibt viel schwächer.

Die Amid-II-Bande der Proteine mit keinem oder nur unvollständigem H_2O-D_2O-Austausch besitzt bei pD 7,4 ein Maximum (1546 cm^{-1}) mit schwachen Schultern bei 1535 und 1555 cm^{-1}. Bei 1515 cm^{-1} befindet sich eine starke Schulter. Durch die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,5 verschwindet die Schulter bei 1555 cm^{-1}, und das Maximum verschiebt sich nach 1547 cm^{-1}. Bei pD 3,0 zeigt die Bande eine Schulter bei 1540 cm^{-1}. Die Absorptionsintensität bei 1535 cm^{-1} hat zugenommen. Bei

pD 2,5 und 2,0 tritt die Amid-II-Bande stärker hervor, weil bei diesen pD-Werten die Absorption der CO_2^--asymmetrischen-Valenzschwingung stark vermindert ist. Neben der Schulter bei 1515 cm^{-1} ist keine weitere vorhanden. Nach der Erhöhung des pD-Wertes auf 7,4 kehrt die Amid-II-Bande in ihre Ausgangsposition zurück und besitzt wieder Schultern bei 1515, 1535 und 1555 cm^{-1}. Die ursprüngliche Intensität erlangt sie nicht wieder.

Die Absorptionsbande im Wellenzahlenbereich 1400-1500 cm^{-1} erleidet bei der Herabsetzung des pD-Wertes von 7,4 auf 3,5 keinen Intensitätsverlust. Bei pD 3,0 gewinnt die Bande, die gleichzeitig an der niederfrequenten Seite schmäler wird, stark an Intensität. Gleichzeitig erhöhen sich die Absorptionen bei 1450, 1460 und 1467 cm^{-1} relativ zur Absorption bei 1440 cm^{-1}. Die Absorptionen bei 1467 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} können den CH_2- und CH_3-Deformationsschwingungen zugeordnet werden. Bei der CH_3-Deformationschwingung handelt es sich um die asymmetrische. Die Absorption bei 1440 cm^{-1} kann der CH_2-Scherenschwingung zugeordnet werden. Um 1450 cm^{-1} absorbieren die Amid-II'-Schwingung und die HDO-Scherenschwingung. Bei pD 2,5 ändert sich nichts an Bandenlage und Intensität. Bei pD 2,0 erhöht sich lediglich die Absorption bei 1440 cm^{-1}. Nach der Rückdialyse gegen den pD 7,4-Puffer ist eine Bandenverbreiterung an der niederfrequenten Seite zu beobachten. Dadurch erhält die Bande, abgesehen vom Maximum, wieder ihren ursprünglichen Verlauf. Im Maximum sind die Absorptionen bei 1450 und 1460 cm^{-1} höher als vor der Erniedrigung der pD-Werte.

Im Wellenzahlenbereich 1300-1400 cm^{-1} folgt durch die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,5 und dann 3,0 eine stufenweise Absorptionsabnahme bei 1390 cm^{-1}. Dadurch tritt eine Schulter bei 1380 cm^{-1} zunächst etwas deutlicher hervor. Bei pD 3,0 ist sie als schwache Bande freigelegt. Gleichzeitig wird eine Bande bei 1365 cm^{-1} sichtbar, deren Absorptionsintensität geringer als die der Bande bei 1380 cm^{-1} ist. Bei pD 2,0 liegt der letztgenannte Sachverhalt

nicht mehr vor. Die Absorptionen bei 1365 und 1380 cm^{-1} sind dann gleich hoch. Nach der Rückdialyse der Erythrozytenmembranen gegen den pD-7,4-Puffer wird die Absorption bei 1390 cm^{-1} fast wieder genau so intensiv wie vor der pD-Wert-Erniedrigung. Die Schulter bei 1680 cm^{-1} ist ausgeprägter als nach der ersten Dialyse gegen den pD-7,4-Puffer.

Was die Bande der D_2O-Scherenschwingung betrifft, so bewirkt die Erniedrigung der pD-Werte keine Veränderungen.

An der Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} erhöht sich durch die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,5 die Absorption bei 1027 cm^{-1}. Dadurch wird die Schulter viel ausgeprägter als bei pD 7,4. Weitere pD-Wert-Erniedrigung hat keinen Einfluß auf den Bandenverlauf. Durch die Erhöhung auf wiederum pD 7,4 gewinnt die Schulter nicht mehr die ursprüngliche Intensität zurück.

c) Mit Ca^{2+} (Abb. 31 a,b, Tab. 9)

Bei pD 7,4 ist die Bande der C=O-Valenzschwingung in ein Maximum bei 1733 cm^{-1} und ein zwischen 1727-1720 cm^{-1} verlaufendes aufgespalten. Beide besitzen die gleiche Absorptionsintensität. Bei pD 4,0 verschiebt sich das höherfrequente Maximum nach 1737 cm^{-1} und das Maximum bei niedrigen Wellenzahlen verläuft zwischen 1730-1720 cm^{-1}. Gleichzeitig erhöht sich die Intensität der Bande ein wenig. Eine weitere, diesmal kräftige Absorptionserhöhung, die vor allem bei 1720 cm^{-1} sehr stark ist, wird durch die Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,04 bewirkt. Bei pD 2,0 verschiebt sich das höherfrequente Maximum auf 1736 cm^{-1}. Die Absorptionsintensität wird im Vergleich zum übrigen Bandenbereich der C=O-Valenzschwingung äußerst kräftig. Nach der Erhöhung des pD-Wertes auf 6,34 erhält die Bande ihre Ausgangsintensität zurück.

Bei pD 7,4 (1. Dialyse) besitzt die Amid-I-Bande gleich hohe Absorptionsmaxima bei 1640 und 1647 cm^{-1} sowie Schultern bei 1630, 1655 und 1685 cm^{-1}. Von den drei Schultern ist die bei 1655 cm^{-1} am stärksten ausgeprägt. Die Schultern

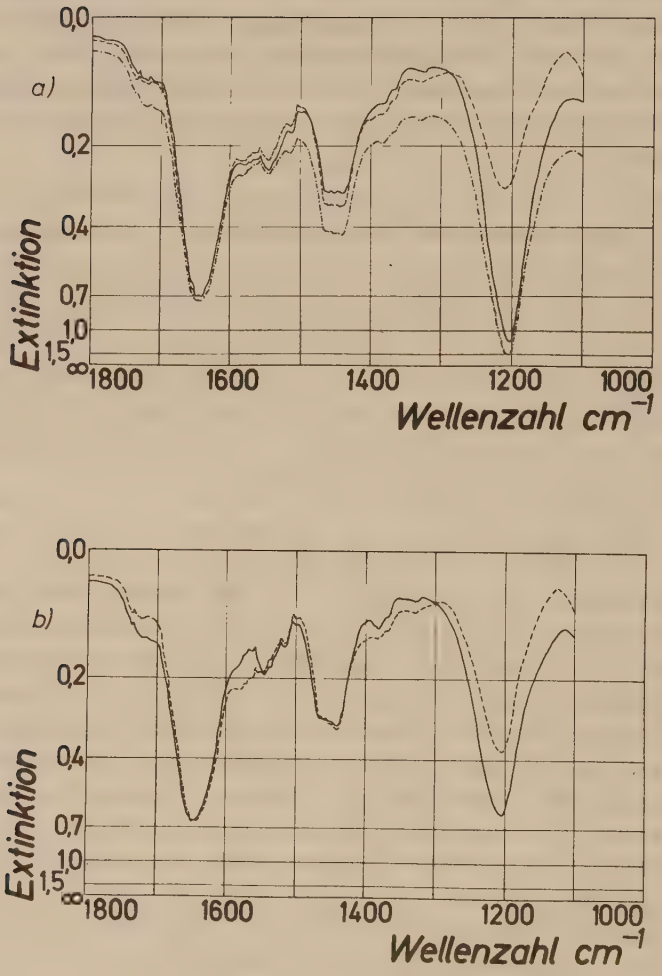


Abb. 31a,b: pD-Abhängigkeit der Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen. Die hierbei verwendeten Kakodylatpuffer enthielten 25 mMol statt 50 mMol $CaCl_2$.*
a: —— pD 7,4, --- pD 4,0, -·-·- pD 3,04
b: —— pD 2,0, --- pD 6,34

* Zu den Puffern vgl. S. 48

pD-Wert / Zuordnung	7,4	4,0	3,04	2,0	6,34
Amid-I	1685 sh 1655 sh 1647 s 1640 s 1630 sh	1685 sh 1655 sh 1647 s 1640 s 1630 sh	1690 sh 1655 sh 1647 s 1640 s 1630 sh	1687 sh 1655 sh 1649 s 1642 sh 1630 sh	1685 sh 1655 sh 1647 s 1640 s 1630 sh
$-CO_2^-$-asym. Valenz	1579 m 1570 sh 1560 sh	1579 m 1570 sh 1560 sh	1383 m 1570 sh 1560 sh	1580 sh 1560 w 1560 w	1580 m 1570 sh 1560 sh
Amid-II	1545 s 1535 sh 1515 sh 1552 sh	1545 s 1535 sh 1515 sh 1552 sh	1545 s 1535 sh 1515 sh 1552 sh	1545 s 1535 sh 1515 sh 1552 sh	1546 s 1535 sh 1515 sh 1555 sh

Tab. 9: Zusammenstellung der Banden von Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen, bei denen die größten Veränderungen bei der Variation der pD-Werte auftraten. Die Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer, gegen welche die Erythrozytenmembranen dialysiert wurden, waren 25 mmolar an $CaCl_2$. (Die übliche $CaCl_2$-Konzentration war 50 mmolar)[2]
Zu den Intensitätsbezeichnungen: Vgl. Abkürzungen: S. 52 ; sh = Schulter

bei 1630 cm^{-1} und 1655 cm^{-1} besitzen etwa die gleiche Intensität. Bei pD 4,0 wird die Absorption bei 1655 cm^{-1} intensiver als bei 1630 cm^{-1}. Als weitere Veränderung ist die Abschwächung der Schulter bei 1685 cm^{-1} zu nennen. Bei pD 3,04 ist die Absorption bei 1640 cm^{-1} intensiver als bei 1647 cm^{-1}. Zwischen 1630-1640 cm^{-1} ist die Bande gegenüber derjenigen bei pH 4,0 verbreitert. Die vorher bei 1685 cm^{-1} liegende sehr schwache Schulter befindet sich nun bei 1690 cm^{-1} und ist wieder stark ausgeprägt. Die pD-Erniedrigung auf 2,0 bewirkt die Verschiebung der Amid-I-Bande zu hohen Wellenzahlen. Die Bande besitzt dann ein Maximum bei 1649 cm^{-1} und Schultern bei 1630, 1642, 1655 sowie 1687 cm^{-1}. Dabei ist die Absorptionsintensität bei 1655 cm^{-1} weit höher als bei 1630 cm^{-1}. Nach der Dialyse gegen den pD 6,34-Puffer verschiebt sich die Bande wieder zu kleinen Wellenzahlen und besitzt, abgesehen

von den Schultern bei 1655 cm^{-1} und 1630 cm^{-1}, den gleichen Verlauf, wie es bei pD 7,4 der Fall ist. Während bei pD 7,4 die Absorption bei 1655 cm^{-1} niedriger als bei 1630 cm^{-1} ist, liegt nun der umgekehrte Sachverhalt vor.

Auch im Wellenzahlenbereich 1500-1600 cm^{-1} bedingt die Erniedrigung der pD-Werte starke Veränderungen. Bei pD 7,4 befindet sich die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung bei 1579 cm^{-1} und besitzt Schultern bei 1570 und 1560 cm^{-1}. Nach der Erniedrigung der pD-Wertes auf 3,04 verschiebt sich das Maximum der etwas intensiver werdenden Bande, nach 1583 cm^{-1}, ohne daß sich die Lage der Schulter verändert. Bei pD 2,0 vermindert sich die Absorptionsintensität im Wellenzahlenbereich 1560-1583 cm^{-1} derart, daß bei 1580 cm^{-1} nur eine Schulter vorliegt. Bei 1560 cm^{-1} ist nun eine sehr schwache Bande freigelegt. Die durch die Erniedrigung der pD-Werte hervorgerufenen Veränderungen sind bereits bei pD 6,34 reversibel.

Die Amid-II-Bande von Proteinen, an denen der H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat, besitzt bei pD 7,4 ein Maximum bei 1545 cm^{-1} und Schultern bei 1535, 1515 und 1552 cm^{-1}. An diesem Verlauf ändert sich bei pD 4,0 nichts. Bei pD 3,04 jedoch wird einerseits die Schulter bei 1652 cm^{-1} schwächer, andererseits nimmt die Bandenintensität stark ab.

Bei pD 2,0 besitzt die Bande wieder ihre ursprüngliche Intensität. Da die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung bei diesem pD-Wert eine sehr geringe Intensität besitzt, ist die Amid-II-Bande nun stärker freigelegt. Nach der Erhöhung des pD-Wertes auf 6,34 befindet sich das Maximum der Bande bei 1546 cm^{-1} und besitzt eine sehr starke Unsymmetrie bei 1555 cm^{-1}.

Die Bande im Wellenzahlenbereich 1400-1500 cm^{-1} erfährt beim Übergang von pD 7,4 auf 4,0 eine starke Intensitätszunahme. Während bei pD 7,4 die Maxima der Banden, die sich in diesem Wellenzahlenbereich überlagern, die gleiche Intensität besitzen, werden bei pD 4,0 die Absorptionen bei 1440 und 1452 cm^{-1} ein wenig stärker als bei 1453 und 1440 cm^{-1}.

Bei pD 3,0 sind die beiden niederfrequenten Absorptionen stärker als die höherfrequenten. Der Übergang auf pD 2,0 bringt die größten Veränderungen mit sich. Sie beruhen darauf, daß sich die Bande an der höherfrequenten Seite verbreitert. Gleichzeitig wird die Absorption bei 1440 cm^{-1} am intensivsten. Nach der Dialyse gegen den pD 6,34-Puffer verschiebt sich die Bande zwar in die Ausgangslage zurück, die Absorptionsintensität bei 1440 cm^{-1} nimmt jedoch weiter zu. Somit sind die Veränderungen an dieser Bande nicht vollständig reversibel.

Im Wellenzahlenbereich zwischen 1300-1400 cm^{-1} besitzt das Spektrum der Erytrhozytenmembranen, die gegen den pD-7,4-Puffer dialysiert wurden, starke Schultern bei 1380 cm^{-1} cm^{-1} (CH_3-symmetrische Deformationsschwingung), 1365 cm^{-1} (CH_2-Torsionsschwingung) und 1325 cm^{-1} (Bande, die zur Bandenserie der $(CH_2)_n$-Nickschwingungen gehört). Bei pD 4,0 verschiebt sich die Schulter, die vorher bei 1365 cm^{-1} vorlag , nach 1367 cm^{-1}. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Bande bei 1327 cm^{-1} zu. Nach der Erniedrigung des pD-Wertes auf 3,04 verschiebt sich die Bande bei 1380 cm^{-1} nach 1382 cm^{-1}. Die Bande bei 1327 cm^{-1} verschiebt sich nach 1330 cm^{-1}. Bei pD 2,0 vermindert sich die Absorptionsintensität bei 1400 cm^{-1} in solchem Maße, daß die Bande bei 1382 cm^{-1} deutlich hervortritt. Außerdem verbreitert sich die Bande bei 1330 cm^{-1}. Als Folge der Erhöhung des pD-Wertes auf 6,34 nimmt die Absorption bei 1400 cm^{-1} wieder zu, erlangt jedoch nicht die Intensität wie bei pD 7,4.

Die Bande der D_2O-Scherenschwingung besitzt bei pD 7,4 ein Maximum bei 1205 cm^{-1}. Bei pD 4,0 und 3,04 liegt es bei 1208 cm^{-1}. Nach der Erniedrigung des pD-Wertes auf 2,0 befindet es sich wieder bei 1205 cm^{-1}. Bei dieser Wellenzahl ist es auch nach der Dialyse gegen den pD-6,34-Puffer anzutreffen.

5.2.4 pD-Abhängigkeit bei zwei verschiedenen Konzentrationen von $CaCl_2$ im Kakodylat-Puffer

5.2.4.1 Durchgeführte Meßreihen

Bei dieser Versuchsserie wurden Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer verwendet, die 50 und 25 mmolar an $CaCl_2$ waren. Die Erythrozytenmembranen wurden abwechselnd gegen die unterschiedlich konzentrierten Puffer dialysiert, wobei stets zuerst gegen den geringer konzentrierten Puffer dialysiert wurde. Die Puffer besaßen die pD-Werte 7,4, 6,34 und 3,04.

5.2.4.2 Resultate (Abb. 32, Tab. 10)

Bei pD 7,4 zeigen sich im Wellenzahlenbereich 1650-1800 cm^{-1} weit mehr konzentrationsabhängige Unterschiede als bei pD 6,34 und 3,04.

Nach der Dialyse gegen den Kakodylat-Puffer, der 25 mMol $CaCl_2$ enthielt, ist die Bande der C=O-Valenzschwingung in zwei Maxima bei 1733 cm^{-1} und eines, welches zwischen 1727-1720 cm^{-1} verläuft, aufgespalten. Nach der Verwendung des höher konzentrierten Puffers befinden sich die Maxima bei 1737 und 1732 cm^{-1}.

Im Spektrum der Erythrozytenmembranen, die gegen den Puffer mit 25 mMol $CaCl_2$ dialysiert wurden, besitzt die Amid-I-Bande gleich hohe Maxima bei 1640 und 1647 cm^{-1}. Schultern befinden sich bei 1630, 1655 und 1685 cm^{-1}. Die Dialyse der Erythrozytenmembranen gegen den Kakodylat-Puffer mit 50 mMol $CaCl_2$ hat zur Folge, daß sich die Amid-I-Bande zu höheren Wellenzahlen verschiebt. Die Maxima befinden sich dann bei 1650 und 1642 cm^{-1}. Schultern liegen bei 1655 und 1635 cm^{-1} vor.

Bei Verwendung des Puffers mit 25 mMol $CaCl_2$ ist die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung von weitaus geringerer Intensität, als es beim Puffer mit der doppelten Menge $CaCl_2$ der Fall ist. Das Maximum bei 1580 cm^{-1} weist dabei Unsymmetrien bei 1562 und 1572 cm^{-1} auf. Mit 50 mMol $CaCl_2$ im Kakodylat-Puffer besitzt die Bande ein Maximum bei 1580 cm^{-1}

sowie Schultern bei 1575 und 1565 cm^{-1}.

Auch bei pD 6,34 bewirken die unterschiedlichen $CaCl_2$-Konzentrationen der Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer, daß sich die Maxima der Bande der C=O-Valenzschwingung unterscheiden. Sie sind mit 25 mMol bei 1737 und 1720 cm^{-1} anzutreffen. Mit 50 mMol befinden sich die Maxima bei 1737 und 1727 cm^{-1}.

Wie bereits eingangs erwähnt sind die Unterschiede an der Amid-I-Bande bei pD 6,34 nicht so groß wie bei pD 7,4. In beiden Spektren besitzt die Bande mit dem Maximum bei 1642 cm^{-1} Schultern bei 1650,1656 und 1687 cm^{-1}. Die Amid-I-Bande der Membranen, die gegen den weniger konzentrierten Puffer dialysiert wurden, besitzt außerdem eine Schulter bei 1635 cm^{-1}. Ferner ist sie an der höherfrequenten Seite etwas verbreitert.

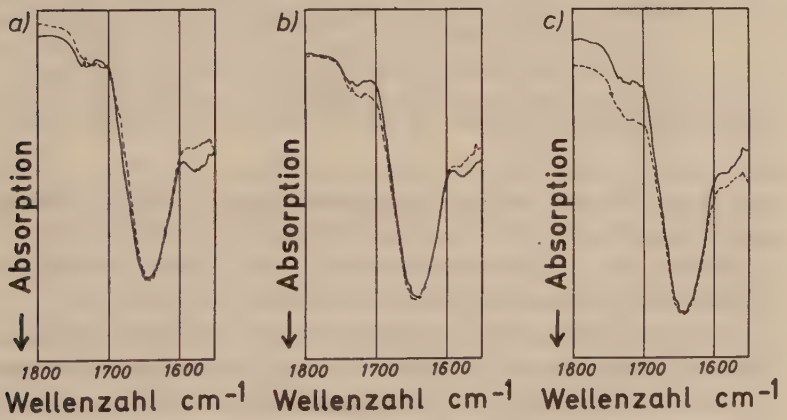


Abb. 32a-c: Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen bei den pD-Werten 7,4, 6,34 und 3,04. Bei dieser Versuchsserie wurden die Membranen abwechselnd gegen Puffer, die 50 und 25 mmolar an $CaCl_2$ waren, dialysiert. Es wurde bei jedem pD-Werte zunächst gegen den geringer konzentrierten Puffer dialysiert.
a: pD 7,4, b: pD 6,34, c: 3,04
—— 50 mmolar, --- 25 mmolar

pD-Wert	7,4		6,34		3,04	
Konz. mMol/l	25	50	25	50	25	50
Wellenzahl cm^{-1} / Zuordnung						
C=O-Valenz	1733m 1727- 1720 } m	1737m 1732m	1737m 1720m	1737m 1727m	1737m 1720m	1737m 1722- 1730 } m
Amid-I	1685sh 1655sh 1647s 1640s 1630sh	1655sh 1650s 1642s 1635sh	1687sh 1656sh 1650sh 1642s 1635sh	1687sh 1656sh 1650sh 1642s	1680sh 1655sh 1647- 1640 } s 1630sh	1680sh 1655sh 1647- 1640 } s 1630sh
CO_2^--asym. Valenz	1580sh 1572sh 1562sh	1580sh 1575m 1565m	1580sh 1575m 1563w	1580m	1582m 1565m	1580m 1570m 1560m

Tab.10: Zusammenstellung der Banden von Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen im Wellenzahlenbereich 1800-1650 cm^{-1}. Unter Veränderung der pD-Werte waren die Erythrozytenmembranen gegen Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert worden, die in einer Versuchsreihe 50 mmolar und in einer anderen Versuchsreihe 25 mmolar an $CaCl_2$ waren. Die Konzentration von Ca^{2+}-Kakodylat war in beiden Fällen 5 mmolar.

Auch die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung zeigt bei pD 6,34 konzentrationsabhängige Unterschiede. Einerseits ist bei Verwendung des 50 mMol $CaCl_2$ enthaltenden Puffers die Intensität größer, andererseits existiert ein Absorptionsmaximum ohne Schultern. Es befindet sich bei 1580 cm^{-1}. Dagegen weist die Bande der Erythrozytenmembranen, die gegen den weniger konzentrierten Puffer dialysiert wurden, ein Maximum bei 1580 cm^{-1} mit Unsymmetrien bei 1575 und 1563 cm^{-1} auf.

Bei pD 3,04 besitzt das Spektrum der Erythrozytenmembranen in dem weniger konzentrierten Puffer eine Bande der C=O-Valenzschwingung mit Maxima bei 1737 und 1720 cm^{-1}.

Die Verwendung des höher konzentrierten Puffers bewirkte, daß ebenfalls ein Maximum bei 1737 cm^{-1} liegt. Ein zweites Maximum erstreckt sich zwischen 1722-1730 cm^{-1}.

Unabhängig von der Konzentration der Puffer besitzt die Amid-I-Bande ein Maximum zwischen 1647-1640 cm^{-1}. Schultern befinden sich bei 1680, 1655 und 1630 cm^{-1}. In beiden Fällen ist das niederfrequente Absorptionsmaximum etwas intensiver als das höherfrequente. Die Schulter bei 1655 cm^{-1} ist jeweils etwas ausgeprägter als die bei 1630 cm^{-1}.

Bei pD 3,04 sind die Intensitätsunterschiede an der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung nicht mehr so groß wie bei pD 7,4 und 6,34. Das Spektrum der Erythrozytenmembranen, die gegen den konzentrierteren Puffer dialysiert wurden, besitzt ein Maximum bei 1580 cm^{-1} mit Unsymmetrien bei 1570 und 1560 cm^{-1}. Die Membranen, die mittels des weniger konzentrierten Puffers mit Ca^{2+} beladen wurden, weisen eine Bande mit einem Maximum bei 1582 cm^{-1} und einer schwachen Schulter bei 1565 cm^{-1} auf.

5.3. Diskussion der Resultate mit Erythrozytenmembranen

In der nachfolgenden Diskussion wird den Banden der Phospholipide nicht wie beim Myelin ein gesonderter Abschnitt gewidmet. Einmal aus dem Grunde, weil Erythrozytenmembranen weniger Phospholipide als Myelin enthalten. Zum anderen, weil bei allen Versuchen mit Erythrozytenmembranen keine derartigen Veränderungen an den Banden der Phospholipide festzustellen waren, die auf eine Phasenumwandlung der Lipide hätten schließen lassen.

Zunächst soll in der Tabelle 11 von allen verwendeten Puffern die Molarität der darin vorhandenen Kationen angegeben werden, um eine bessere Vorstellung von dem jeweiligen Ionenmilieu zu vermitteln.

M. der Kationen mMol / Kationen	p.L.	K^+-p.L.	Na^+-p.L.	K^+-P	Na^+-P	Ca^{2+}-P
Na^+	160	3,0	163	-	105	-
K^+	5,6	160	-	105	-	-
Ca^{2+}	2,2	2,2	2,2	-	-	55*

Tab. 11: Molarität der Kationen in den verwendeten Puffern.
Abkürzungen: p.L. = physiologische Lösung;, P = Kakodylat-Puffer; M. = Molarität

*Bei einer Versuchsserie wurde ein Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer verwendet, der 25 mmolar an $CaCl_2$ war. Die gesamte Ca^{2+}-Konz. betrug 3o mMol.

Bevor die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert werden, sollen die Resultate zur Proteinkonformation in Erythrozytenmembranen vorangestellt werden, die von Graham et al. (28) erhalten wurden. Ausführlichere Erläuterungen zu seinen Versuchsbedingungen folgen im Abschnitt 5.4., S.127.

Graham et al. erhielten als erste Forscher Resultate, aus denen hervorging, daß sich Proteine von Erythrozytenmembranen unter bestimmten Bedingungen von α- und/oder Zufallsknäuelkonformation zur ß-Struktur umfalten können.

Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation in Erythrozytenmembranen, die mit H_2O behandelt wurden, bedingten, daß die Amid-I-Bande das Maximum bei 1652 cm^{-1} besaß. Steigende Absorptionsintensität zwischen 1625-1640 cm^{-1} wurde als die Zunahme von ß-Struktur gewertet. Bei Erythrozytenmembranen, die mit D_2O behandelt worden waren, zeigte sich bei α-Struktur (auch Zufallsknäuel) das Absorptionsmaximum zwischen 1648-1650 cm^{-1}. Erhöhte sich die Absorptionsintensität zwischen 1630-1640 cm^{-1}, schlossen Graham et al. auf die Bildung von ß-Konformation. Eine Schulter bei 1690 cm^{-1} wurde als Indiz für die Bildung von antiparalleler ß-Struktur gewertet. Die Basis der Interpreta-

tionen von Graham et al. war der Vergleich der Spektren von Proteinen in bekannter Konformation - und auch von Gemischen dieser Proteine - mit den Spektren von Erythrozytenmembranen. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlossen Graham et al. auf die Existenz der Zwischenstrukturen (Vgl. S. 55).

Wie sich im Verlauf der Diskussion zeigen wird, lassen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Zwischenstrukturen schließen.

5.3.1 Diskussion der Resultate zum Einfluß verschiedener Kationen im pH- bzw. pD-Bereich 7,0-7,4

(i) In H_2O (Abb. 23 a,b, 24, Tab A 3)

Zunächst soll auf die Konformation der Proteine in den Erythrozytenmembranen eingegangen werden, die gegen die verschiedenen physiologischen Lösungen (Siehe S. 79) und H_2O dialysiert wurden. Die Amid-I-Bande der Membranen in physiologischer Lösung ist am stärksten zu kleinen Wellenzahlen verschoben*. Da die Bande Schultern bei 1685 sowie 1635 cm^{-1} besitzt, während eine Schulter um 1650 cm^{-1} fehlt, kann folgende Schlußfolgerung gezogen werden:

Die Erythrozytenmembranen, die gegen physiologische Lösung dialysiert wurden, enthalten die meisten Proteine in antiparalleler ß-Struktur.

Obwohl die Na^+-physiologische Lösung und die physiologische Lösung fast die gleiche Na^+-Konzentration enthielten (Vgl. Tab 11), unterscheiden sich die Amid-I-Banden der gegen diese Lösungen dialysierten Erythrozytenmembranen und somit auch die Konformation der Proteine erheblich. Da die physiologische Lösung auch K^+-Ionen enthielt, müßte zunächst darauf geschlossen werden, daß K^+ die Bildung von mehr antiparaller ß-Struktur induziert. Jedoch in Gegenwart von hauptsächlich K^+-Ionen gibt es nicht soviel Proteine, die in antiparaller ß-Struktur vorliegen.

---

* Diesen Unterschied sieht man nur beim Übereinanderlegen der Spektren aus Abb. 23 a und b.

Da - wenn gleichzeitig Na^+ und K^+ vorliegen - sich die meiste antiparallele ß-Struktur bildet, kann die Schlußfolgerung gezogen werden:

Die Proteine der Erythrozytenmembranen benötigen das gleichzeitige Vorhandensein von Na^+ und K^+, um sich bevorzugt in antiparallele ß-Struktur umfalten zu können.

Diese Aussage soll aber nur in Bezug auf die physiologischen Puffer gemacht sein.

Nun zum Einfluß der Kakodylat-Puffer auf die Konformation der Proteine: Selbst wenn die Kakodylat-Puffer Kationen in ähnlicher Konzentration wie die physiologischen Lösungen enthielten, zeigte sich insbesondere im Maximum der Amid-I-Bande ein recht unterschiedlicher Bandenverlauf. Die Ursache dürfte sein, daß Kakodylat einen gewissen Einfluß auf die Struktur der Proteine auszuüben vermag.

Bei den gegen die Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen scheint in jedem Falle antiparallele ß-Struktur vorzuliegen. Hierauf weisen die Schultern bei 1635 und 1690 cm^{-1} hin. Die Schulter bei 1635 cm^{-1} wird in der Reihenfolge $K^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow Ca^{2+}$ kräftiger. Hieraus kann gefolgert werden: Erythrozytenmembranen enthalten in Gegenwart von Ca^{2+} mehr Proteine in ß-Struktur, als es mit Na^+ und K^+ der Fall ist.

Ein sehr unterschiedlicher Einfluß der drei Kationen wird auch an der Amid-II-Bande der Membranen deutlich, die gegen die Kakodylat-Puffer dialysiert wurden (Abb. 24). Die Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen weisen eine gegenüber den Banden der Na^+- und K^+-Erythrozytenmembranen bei kleinen Wellenzahlen stark verbreiterte Bande auf. Auch dieser Befund läßt darauf schliessen, daß mit Ca^{2+} mehr Proteine als mit Na^+ und K^+ ß-strukturiert sind.

Auch an der Amid-II-Bande macht sich ein sehr großer Unterschied zwischen den Kakodylat-Puffern und den physio-

logischen Lösungen bemerkbar. Bei den Kakodylat-Puffern besteht kein Intensitätsunterschied in Gegenwart von Na^+ oder K^+. Die Bande der Membranen in Na^+-physiologischer Lösung ist dagegen intensiver als die der Membranen in K^+-physiologischer Lösung. Der Unterschied muß auf die verschiedenen Anionen in den Kakodylat-Puffern und den physiologischen Lösungen zurückzuführen sein. Leider können keine Aussagen darüber gemacht werden, welche Wechselwirkungen zwischen den Anionen und den Proteinen stattfinden.

Wie aus den Banden des Wellenzahlenbereichs 1500-1300 cm^{-1}. hervorgeht, dürften die Wechselwirkungen außer mit Proteinen auch mit Lipiden stattfinden (Vgl. Abb. 23 a,b und 24). Auch ein unterschiedlicher Kationeneinfluß macht sich in diesem Wellenzahlenbereich bemerkbar: Die Bande der CH_2-Deformationsschwingung ist nur in Gegenwart von Ca^{2+} gespalten. Es kann darauf geschlossen werden, daß die Zweiwertigkeit des Kations eine Rolle spielt. Die Tatsache, daß die Bande der CH_2-Torsionsschwingung nur in Gegenwart von Na^+ und Ca^{2+} auftritt, kann damit erklärt werden, daß diese beiden Kationen ein größeres elektrisches Feld als K^+ besitzen.

Die gleiche Erklärung dürfte auch für die Lage der Banden der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung und P=O-Valenzschwingung gelten. Deren Maxima befinden sich mit Ca^{2+} und Na^+ bei höheren Wellenzahlen als mit K^+. Ein unterschiedlicher Einfluß der Anionen ist an diesen Banden nicht feststellbar.

Hingegen zeichnet sich an der Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} ein unterschiedlicher Anioneneinfluß ab. Denn die Intensität der Bande in den Spektren der Membranen, die gegen die Kakodylat-Puffer dialysiert wurden, ist weitaus intensiver als in den Spektren der mit physiologischen Lösungen und H_2O behandelten Membranen. Dieser Unterschied ist wegen der Vielzahl der Schwingungen, die in diesem Bereich angeregt werden, schwer erklärbar.

(ii) In D_2O

Wie der Tabelle A_3 und der Abb. 25 zu entnehmen ist, besitzen die Amid-I-Banden der deuterierten Membranen weit mehr Feinstrukturierung als die der hydratisierten. Die Ursache kann darin liegen, daß an manchen Proteinen der H_2O-D_2O-Austausch bereits stattgefunden hat, bei anderen hingegen noch nicht. Dadurch überlagern sich die Banden der hydratisierten und deuterierten Proteine und bedingen das Vorhandensein der vielen Schultern. Befinden sich Banden bei den Wellenzahlen, die weder für α- und/oder Zufallsknäuel- noch ß-Konformation charakteristisch sind, dürften seltene Proteinstrukturen (Übergangsstrukturen) vorliegen (Siehe S. 54). Im folgenden soll auf die in D_2O möglichen Proteinkonformationen eingegangen werden:*

1. Die Schulter bei 1655 cm^{-1} könnte einerseits durch Proteine in seltener Konformation bedingt sein. Andererseits könnte es sich um die Banden der Proteine in α-und/oder Zufallsknäuelkonformation handeln, bei denen ein H_2O-D_2O-Austausch noch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat.

2. Die Maxima bei 1647 cm^{-1} (Na^+ und K^+) und bei 1650 cm^{-1} (Ca^{2+}) dürften der α- und/oder Zufallsknäuelkonformation der Proteine, die deuteriert wurden, zuzuordnen sein.

3. Die Schulter bei 1630 cm^{-1} könnte auf die Absorption vollständig deuterierter Proteine in ß-Konformation zurückzuführen sein. Ein anderer Grund für das Vorhandensein dieser Schulter könnte die Existenz einer seltenen Proteinkonformation sein, die sich bei deuterierten Erythrozytenmembranen vorzugsweise in Gegenwart von Na^+ und Ca^{2+} ausbildet. Daß es sich um einen Deuterierungseffekt handelt, muß aus dem Fehlen dieser Schulter bei hydratisierten Erythrozytenmembranen geschlossen werden.

4. Die sehr schwachen Schultern bei 1687 cm^{-1} mit K^+ sowie Ca^{2+} und bei 1690 cm^{-1} mit Na^+ weisen auf das Vorhanden-

---

* Es handelt sich um die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit.

sein von einigen Proteinen in antiparalleler ß-Struktur hin. Da die Schulter in allen Fällen sehr schwach ist, kann darauf geschlossen werden, daß der größte Anteil der Faltblattstruktur von parallel angeordneten Polypeptidketten gebildet wird. Dabei unterscheidet sich der Einfluß der Kationen dahingehend, daß Na^+ mehr als K^+ und Ca^{2+} die Bildung von antiparalleler ß-Struktur induziert.

6. Kalium dürfte bei den deuterierten Erythrozytenmembranen bewirken, daß mehr Proteine in α- und/oder Zufallsknäuel- als in ß-Struktur entstehen. Diese Schlußfolgerung kann deswegen gezogen werden, weil die Absorption bei 1647 cm^{-1} stärker als bei 1640 cm^{-1} ist. Außerdem bildet sich mit K^+ wenig von der Konformation aus, die in Gegenwart von Ca^{2+} und Na^+ entsteht (Vgl. Punkt 4).

An der Amid-II-Bande ist besonders auffällig, daß sie in dem Spektrum der Ca^{2+} - Erythrozytenmembranen fast verschwunden ist.* Dies bedeutet, daß Ca^{2+} den H_2O-D_2O-Austausch fördert. Im übrigen lassen die Schultern bei 1555 und 1535 cm^{-1} in den Spektren der Ca^{2+} und Na^+-Membranen darauf schließen, daß in Gegenwart dieser Kationen mehr ß-Struktur (antiparallel oder parallel) als mit K^+ vorliegt.

Wie schon bereits früher erwähnt, absorbieren im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} die HDO-Scherenschwingung und die Amid-II'-Schwingung. Da die Bande des eben genannten Wellenzahlenbereichs im Ca^{2+}-Spektrum die größte Intensität besitzt, kann wiederum darauf geschlossen werden, daß Ca^{2+} den H_2O-D_2O-Austausch begünstigt. Na^+ wiederum scheint einen verlangsamenden Einfluß auf den Austausch auszuüben.

Was die Bande bei 1330 cm^{-1} anbetrifft, so kann gefolgert werden: Ca^{2+} und Na^+ fördern in der -COOD-Gruppe die Kopplung der OD-Deformationsschwingung mit der C-O-Valenzschwingung (Vgl. S. 87)

---

*Wenn bei Erythrozytenmembranen mehrere Dialysen gegen einen Na^+- oder K^+-Kakodylat-Puffer hintereinander erfolgten, so konnte dieser Effekt dennoch nicht beobachtet werden.

Das Maximum der Bande der D_2O-Scherenschwingung befindet sich bei 1200 cm^{-1} mit K^+ und bei 1205 cm^{-1} mit Na^+ und Ca^{2+}. Die Verschiebung der Bande mit Na^+ und Ca^{2+} zu höheren Wellenzahlen erklärt sich nach Hayd (122) wie folgt:

Die Übergangsfrequenz im unsymmetrischen Potential steigt mit wachsendem Feld gemäß:

$$\nu = \nu_0 \sqrt{1 + Z^2} \qquad Z \sim F$$

(F entspricht hierbei der Feldstärke)

Die Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} besitzt in Gegenwart von Na^+ und K^+ die gleiche Breite. Die Bande der Ca^{2+}-Membranen ist gegenüber deren Banden verschmälert, besitzt jedoch eine höhere Intensität. Dieses könnte bedeuten, daß einwertige Kationen auf die Bande dieses Wellenzahlenbereichs einen anderen Einfluß als zweiwertige Kationen ausüben*.

5.3.2 Diskussion der Resultate zur Temperaturabhängigkeit

Zunächst soll darauf hingewiesen werden, daß die Ausbildung von Schultern an der niederfrequenten Seite der Amid-I-Bande nicht auf eine temperaturabhängige Verschiebung der H_2O-Scherenschwingung zurückzuführen ist. Nach Waldron (115) verschiebt sich die Wasserbande bei Temperaturerhöhung von 1645 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Außerdem muß noch einmal erwähnt werden, daß von Präparation zu Präparation die Amid-I-Bande und deren Schultern innerhalb eines kleinen Wellenzahlenbereichs ihre Lage verändern. Die Verschiebungen müssen von der Aktivität der Enzyme abhängen. Deren Aktivität hängt z.B. vom Alter der Tiere ab, denen das Blut entnommen wurde. Hierzu berichtet Hanahan (111), daß z.B. die ATPase-Aktivität bei Kälbern mit zunehmendem Alter abnimmt. Wie wir später noch sehen werden, besteht

---

*Dieses gilt nur für die deuterierten Membranen

eine enge Korrelation zwischen der Aktivität der (K^+-Na^+)-abhängigen ATPase und der Proteinkonformation.

Aus den Abbildungen 26 a-d und der Tabelle 7 geht hervor, daß bei den Membranen in physiologischer Lösung sowie in den Ca^{2+}- bzw. K^+-Kakodylat-Puffern durch Temperaturen zwischen 20-30° C die Umfaltung von Proteinen zur ß-Struktur gefördert wird. Bei den Na^+-Erythrozytenmembranen findet bei keiner Temperatur eine Umwandlung statt.

Die Tatsache, daß bereits bei solch niedrigen Temperaturen Umwandlungen von α- und/oder Zufallsknäuel- in ß-Struktur geschehen, ist nach Graham et al. (28,29) auf den Ablauf energieliefernder Prozesse zurückzuführen. Strukturumwandlungen, die nicht mit metabolischen Prozessen verknüpft sind, finden erst bei höheren Temperaturen statt (78,107). Bei 10° C ist der Ablauf der meisten metabolischen Prozesse und damit ein Energiegewinn nahezu Null. Eine Temperaturerhöhung bis zu einem Optimum, welches meist bei 30° C liegt, führt bei vielen metabolischen Prozessen zu einer Steigerung der Enzymaktivität und auch zu einem erhöhten Energiegewinn. Bei weiter steigender Temperatur kommt es zu einer Inaktivierung oder Denaturierung des Enzyms - in den meisten Fällen zwischen 40-50° C (123).

Eines der Enzyme von Erythrozytenmembranen, welches an einer energieliefernden Reaktion beteiligt ist, ist eine (K^+—Na^+) abhängige ATPase. Nun enthält die physiologische Lösung diese beiden Kationen. Daher ist es verständlich, daß die Temperaturerhöhung bei den Proteinen der Membranen, die gegen diese Lösung dialysiert waren, die größte Zunahme von ß-Struktur induziert.

Für die Tatsache, daß auch in Gegenwart der K^+-Ionen durch Temperaturerhöhung eine Zunahme von ß-Struktur bewirkt wird, gibt es ebenfalls eine Erklärung: Kaliumionen sind für die Aktivität des Enzyms Pyruvatkinase unentbehr-

lich. Dieses Enzym ist auch in Erythrozytenmembranen lokalisiert. Bei der Reaktion von Pyruvatkinase mit Phosphoenolpyruvat wird wie bei der Spaltung von ATP Energie frei. Dieses mag als Erklärung für die Bildung von ß-Struktur in Gegenwart von nur Kaliumionen dienen.

Wie Hanahan (111) berichtet, wurde in Präparaten von Erythrozytenmembranen auch eine Ca^{2+}-abhängige ATPase nachgewiesen. Somit kann auch die Ca^{2+}-abhängige Konformationsumwandlung von α- und/oder Zufallsknäuelkonformation in Faltblattstruktur erklärt werden.

5.3.3 Diskussion der Ergebnisse zur pH- und pD-Abhängigkeit der Erythrozytenmembranen

(i) In H_2O (Abb 27a,b und 28 a,b; Tab. A 4)

Generell kann zu den pH-abhängigen Veränderungen gesagt werden, daß es bei fast jeder pH-Wert-Erniedrigung zu einer Konformationsumwandlung kommt. Leider ist bei den Veränderungen an der Amid-I-Bande keine Systematik erkennbar. Es zeigt sich aber deutlich, daß sich die Konformationen der Proteine in Gegenwart von Na^+ und K^+ bei den verschiedenen pH-Werten in sehr unterschiedlicher Weise verändern: Die Spektren lassen darauf schließen, daß ab pH 4,4 die K^+-Erythrozytenmembranen stets mehr Proteine in Faltblattstruktur als die Na^+-Erythrozytenmembranen enthalten. Dieses kann daraus geschlossen werden, daß die Amid-I-Bande mit K^+ stets an der niederfrequenten Seite gegenüber der Bande mit Na^+ verbreitert ist.

Nur bei pH 7,4 und 6,4 scheinen die Erythrozytenmembranen, die gegen Na^+-Kakodylat-Puffer dialysiert wurden, mehr Proteine in ß-Struktur zu besitzen als die K^+-Erythrozytenmembranen.

Die Veränderungen der Konformation der Proteine ist in Gegenwart von K^+ irreversibel (Vgl. Abb. 27 d). Dagegen sind die pH-abhängigen Veränderungen bei den Na^+-Erythrozytenmembranen reversibel. Es kann darauf geschlossen werden, daß

die in Gegenwart von K^+ induzierten Veränderungen zu energetisch günstigeren Konformationen führen, als es mit Na^+ der Fall ist.

Bei den pH-Wert-Erniedrigungen ist sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ die wichtigste Veränderung an der Amid-II-Bande die Verminderung der Bandenbreite an der höherfrequenten Seite. Sie dürfte auf eine zunehmende Protonierung von CO_2^--Gruppen zurückzuführen sein. Die Bandenintensitäten in den Spektren der K^+- und Na^+-Erythrozytenmembranen unterscheiden sich ebenfalls. Wenn auch bei den verschiedenen pH-Werten die Intensitäten variieren, so ist bei dem gleichen pH-Wert die Bande mit Na^+ stets intensiver als mit K^+. Dies könnte darauf hinweisen, daß K^+ bei Erythrozytenmembranen die Intensität der N-H-Deformationsschwingung vermindert.

Der auffälligste Unterschied zwischen dem K^+- und Na^+-Spektrum im Wellenzahlenbereich 1375-1415 cm^{-1} ist bei pH 3,04 und 2,56 zu verzeichnen (Vgl. Abb. 27 c und 28 c). Aus dem Bandenverlauf kann gefolgert werden: Bei niedrigem pH-Wert werden die CO_2^--Gruppen in Gegenwart von K^+ stärker als in Gegenwart von Na^+ protoniert.

(ii) In D_2O (Abbildungen 29-31)

Wie bereits schon in vorausgegangenen Kapiteln erwähnt, stabilisiert D_2O die ß-Konformation der Proteine. Trotz der stabilisierenden Wirkung von D_2O gibt es bei der Variation der pD-Werte Konformationsumwandlungen zu beobachten. Man kann diesen Effekt damit erklären, daß die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden stark vom pH- bzw. pD-Wert beeinflußt werden (109). Bei einer Veränderung der Wechselwirkungen kann es zu Konformationsumwandlungen kommen.

Aus den Spektren, die nach der Rückdialyse gegen die Puffer mit den höchsten pD-Werten aufgenommen wurden, geht weiterhin hervor, daß Ca^{2+} und K^+ auf die Struktur der Proteine, die sich bei niedrigem pD-Wert bildet, einen stabilisierenden Effekt haben. Anders ausgedrückt: In der Gegenwart von

Ca^{2+} und K^+ sind bei niedrigem pD-Wert irreversible Prozesse mehr begünstigt, als wenn das Ionenmilieu Na^+ enthält.

Auch an der Amid-II-Bande zeigen sich bei der Veränderung der pD-Werte Unterschiede in Abhängigkeit von den Kationen. Sehr auffällig ist jedoch, daß sich die Bande in Gegenwart von Ca^{2+} am wenigsten verändert. Dieses scheint ein Widerspruch zu den Ergebnissen zu sein, die in Abschn. 5.3.1 (S. 79, Abb. 25) erläutert werden. An dieser Stelle muß noch einmal auf die Konzentrationen der $CaCl_2$-Puffer eingegangen werden, gegen welche die Erythrozytenmembranen dialysiert wurden. Das Spektrum, das auf die Begünstigung des H_2O-D_2O-Austausches durch Ca^{2+} schließen läßt, wurde von Erythrozytenmembranen aufgenommen, die gegen einen Puffer, der 50 mmolar an $CaCl_2$ war, dialysiert worden waren. Die Aufnahme der Spektren von Abb. 30 a,b erfolgte mit Membranen, die in einem Puffer waren, der nur 25 mmolar an $CaCl_2$ war. Es kann nun darauf geschlossen werden, daß ab einer bestimmten Konzentration von Ca^{2+} der H_2O-D_2O-Austausch begünstigt wird. Wahrscheinlich werden ab dieser Konzentration die Wechselwirkungen zwischen Phsopholipiden und Proteinen in der Weise verändert, daß ein Austausch begünstigt wird. Daß insbesondere Ca^{2+} (sowie auch Mg^{2+}) die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Phospholipiden stört, geht aus Chapmans Arbeit (109) hervor.

Auf die Bande der D_2O-Scherenschwingung nehmen Na^+ und Ca^{2+} bei pD-Wert-Erniedrigung einen ganz anderen Einfluß als K^+. Während die Bande mit Ca^{2+} und Na^+ selbst bei dem niedrigsten pD-Wert ihre Lage unverändert beibehält, verschiebt sie sich mit K^+ um 5 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Wahrscheinlich spielt hier das elektrische Feld der Kationen eine Rolle.

5.3.4 Diskussion der Resultate zur pD-Abhängigkeit bei zwei verschiedenen Konzentrationen von $CaCl_2$

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, beeinflussen die beiden Konzentrationen den H_2O-D_2O-Austausch unterschiedlich.

Während die Proteine bei pD 7,4 in Gegenwart des höherkonzentrierten Puffers mehr Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation enthalten als in Gegenwart des weniger

konzentrierten Puffers, ist bei pD 6,34 der Unterschied nicht mehr so groß. Die Proteine besitzen in Gegenwart der beiden verschiedenen Puffer fast die gleiche Konformation. Dies bedeutet, daß die Proteine in den Erythrozytenmembranen, die gegen den höher konzentrierten Puffer dialysiert wurden, bei pD 6,34 stärker ihre Konformation geändert haben, als es in Gegenwart des weniger konzentrierten Puffers der Fall ist. Bei pD 3,04 macht sich die unterschiedliche Konzentration nicht mehr bemerkbar.

5.4 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den in der Literatur beschriebenen

Wenn laut Literatur (20,21,117) hämoglobinfreie Erythrozytenmembranen auf AgCl-Platten bei -180° C mittels flüssigen Stickstoffs zunächst tiefgefroren und dann getrocknet wurden, gab es wenig Hinweise auf Proteine in Faltblattstruktur. Nachteilig an dieser Methode war der drastische Entzug von Wasser. Auch wenn die Versuche schnellstens durchgeführt wurden, konnten dadurch Strukturumwandlungen von Proteinen verursacht worden sein - nämlich von denen, für deren Struktur hydrophobe Wechselwirkungen dominierend sind. Desgleichen kann auch die Methode von Papakostidis (44), bei welcher den Erythrozytenmembranen während der Filmherstellung ebenfalls Wasser entzogen wurde, die Ausbildung von ß-Struktur verhindert haben. Zu einem derartigen Sachverhalt schreibt Kavanu (118), daß ß-Struktur durch Dehydrieren in globuläre Struktur übergehen müsse. Nach Rudall (107) bildet sich z.B. "Cross"-ß-Struktur nur dann, wenn ausreichend H_2O vorhanden ist. Allerdings ist dabei auch eine genügend hohe Temperatur notwendig.

Nach Anwendung der als unphysiologisch zu wertenden Methoden lag die Amid-I-Bande bei Chapman et al.(89) und Maddy et al. (21) bei 1652 cm^{-1}. Diese Bandenlage läßt,wie bereits im vorausgegangenen Kapitel erwähnt wurde, auf Proteine in

α-helikaler und/oder ungeordneter Konformation schließen. Eine Bande zwischen 1630-1640 cm^{-1}, die auf ß-Struktur hinweist, lag nicht vor.

Desgleichen fehlten in den Spektren, die von Papakostidis aufgenommen wurden, den Amid-I-Banden mit dem Absorptionsmaximum bei 1655 cm^{-1} Schultern bei kleinen Wellenzahlen.

Bei Anwendung mehr physiologischer Präparationsmethoden durch Graham et al. (29), nach denen viele wichtige und sehr empfindliche Membranfunktionen noch intakt waren, konnte durch Hydrolyse von ATP in den Membranen eine Umwandlung von α- helikaler und/oder ungeordneter Struktur in ß-Konformation beobachtet werden. Dieses gelang durch die Hinzugabe von ATP und Mg^{2+}. Die Zunahme der ß-Struktur wurde zusätzlich durch Inkubation von Na^+- und K^+-Ionen, welche die ATP-Hydrolyse stimulieren, gesteigert.

Bei der Hydrolyse von ATP in Gegenwart von Na^+ spaltete sich die Amid-I-Bande in zwei Maxima bei 1654 und 1640 cm^{-1} auf. Weiterhin bewirkte die Hinzugabe von K^+, daß die Bande durch die Absorption bei 1640 cm^{-1} beherrscht wurde, was als Indiz für mehr Proteine in ß- als in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation gewertet wurde.

Hierbei ist von Bedeutung, daß abhängig von verschiedenen Präparationen, auch wenn alle Schritte genauestens kontrolliert wurden, die Lage der Maxima gewissen Schwankungen unterworfen war. Dieses geht auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervor.

Die oben erwähnten Übergänge wurden ebenfalls beobachtet, wenn die metabolischen Reaktionen und die IR-Messungen in D_2O stattfanden. Keine Konformationsumwandlungen konnten beobachtet werden, wenn die ATP-Hydrolyse durch EDTA gehemmt wurde.

Bei Messungen in D_2O zeigten deuterierte Erythrozytenmembranen, in denen keine metabolischen Prozesse mehr abliefen, im Gegensatz zu Membranfilmen eine schwache Schulter bei

1635 cm^{-1}. Eine Schulter in dieser Position wird ebenfalls als Hinweis auf ß-Struktur gewertet (29).

Wurde in Suspensionen von Erythrozytenmembranen der H_2O-D_2O-Austausch so schnell wie möglich mittels 7·mM Phosphatpuffer (pD 7,4) ausgeführt, so besaß die Amid-I-Bande zuerst nur ein Absorptionsmaximum bei 1648-1650 cm^{-1}. Nach zwei Stunden bei 0-1° C oder geringerer Zeit bei höheren Temperaturen zeigte sich eine Schulter bei 1635 cm^{-1}, die im Laufe der Zeit immer stärker wurde und allmählich die Amid-I-Bande beherrschte. Eine Schulter bei 1680 cm^{-1} bildete sich dabei nicht aus.

Die D_2O-abhängige Umwandlung von Proteinen in α-helikaler oder ungeordneter Struktur zu Proteinen in ß-Konformation wird damit erklärt, daß Protein-Struktur im allgemeinen (106) und ß-Strukturen im besonderen (41,42) durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden. Da D_2O bei jeder gegebenen Temperatur mehr strukturiert ist als H_2O, sind hydrophobe Wechselwirkungen in Gegenwart von D_2O stärker (120). Daher wird auch die Bildung von ß-Struktur in Gegenwart von D_2O gefördert.

Was den Temperatureinfluß auf die deuterierten Erythrozytenmembranen anbetrifft, so bewirkt eine Temperaturerhöhung auf 35°-40° C eine beschleunigte Verschiebung der Amid-I-Bande auf einen Wert nahe bei 1640 cm^{-1} (29).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht ebenfalls hervor, daß die untersuchten Erythrozytenmembranen bei Temperaturerhöhung eine größere Anzahl von Proteinen in ß-Konformation besitzen. Desgleichen weist auch die Amid-I-Bande der deuterierten Membranen auf ß-Struktur hin.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Untersuchungsmethode mit den Membransuspensionen in der FMIR-Küvette viel physiologischer als die mit den Filmen auf den optischen Kristallen ist.

Es ist vorstellbar, daß in den Membransuspensionen noch eher metabolische Prozesse ablaufen, die eine Konformations-

umwandlung bedingen, als es bei den Filmen der Fall ist. Insbesondere dürfte dabei der Zeitfaktor eine Rolle spielen. Denn bei Verwendung der FMIR-Küvette konnten die ersten Messungen bereits drei Stunden nach Beendigung der Präparation stattfinden. Dagegen lagen bei den von Papakostidis durchgeführten Versuchsreihen zwischen Präparationsende und den ersten Messungen mindestens 114 Stunden.

Insbesondere wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer verzichtet. EDTA blockiert ja, wie bereits erwähnt wurde, die ATP-Hydrolyse und hemmt damit einen Übergang von α- in ß-Struktur (29).

Somit könnten die Kombination der Messungen in der FMIR-Küvette und der Verzicht auf die Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer die mit der Literatur übereinstimmenden Ergebnisse bewirkt haben (29), nämlich, daß Erythrozytenmembranen nicht nur Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation enthalten.

6. Messungen und Resultate mit Membranen aus Rattenhirn

6.1 Erläuterungen zu den aus Rattenhirn untersuchten Membranen

Die funktionelle Einheit des Gehirns ist die Nervenzelle. Bei der Subfraktionierung des Gehirns können die einzelnen Membrananteile, die zur Nervenzelle gehören, voneinander getrennt werden. Von den Membrananteilen, die sich in den Subfraktionen befinden, die im Verlauf dieser Arbeit untersucht wurden, folgen kurze Beschreibungen:

6.1.1 Myelin

Die Aufgabe des Myelins wird bereits in Abschnitt 4.1, S. 57 beschrieben. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß sich die Zusammensetzung der darin enthaltenen Phospholipide (Lipide) von Spezies zu Spezies stark unterscheidet. Ferner hängt die Zusammensetzung auch vom Lebensalter ab, da die Myelinisierung erst postnatal stattfindet (113). Nun zum Axon, das in der markhaltigen Nervenfaser vom Myelin umhüllt ist.

6.1.2 Das Axon

Der Fortsatz einer Nervenzelle, der den elektrischen Impuls zu einer anderen Nervenzelle oder zu einer Muskel- oder Drüsenzelle weiterleitet, ist das Axon (110).

Die Membran des Axons bedingt durch sich verändernde Permeablilitätseigenschaften die Weiterleitung der elektrischen Erregung. Beim sogenannten Ruhepotential ist sie bevorzugt für K^+-Ionen permeabel. Beim sogenannten Aktionspotential ist sie auch von Na^+-Ionen permeierbar. Für die Ursachen dieser Permeabilitätsveränderung liegen bislang nur Theorien vor (34-37;7).

Mehr Kenntnisse gibt es jedoch über die Übertragung des elektrischen Impulses von Nerv zu Nerv. Sie findet an der Synapse statt.

6.1.3 Die Synapse (Vgl. Abb. 33)

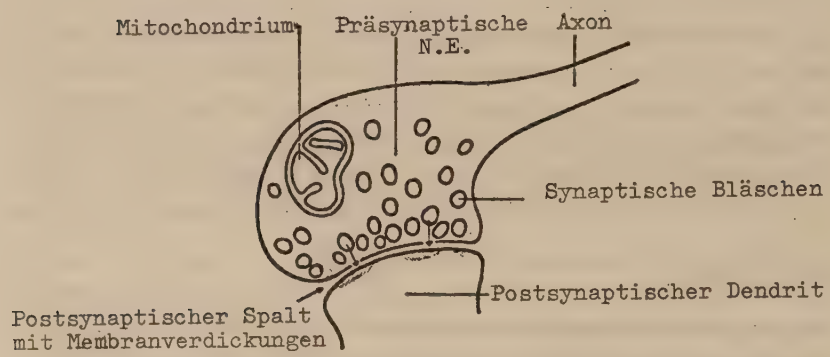


Abb. 33: Schematische Darstellung einer Synapse
(Aus: Krnjević, K., Endeavour, London 25, 8 (1966))
Abkürzung: N.E. Nervenendigung

Die Synapse bildet die Verbindung von einer Nervenzelle zu einer anderen. Es besteht jedoch keine direkte Verbindung zwischen den Membranen zweier Nervenzellen, sondern sie sind durch den postsynaptischen Spalt voneinander getrennt. Über diesen Spaltraum erfolgt mittels chemischer Vermittlung durch die Transmittermoleküle die Übertragung der Nervenerregung (125).

Die innere Morphologie der Synapse ist gekennzeichnet durch die synaptischen Bläschen - die wahrscheinlich Transmittermoleküle speichern - und die präsynaptischen Mitochondrien. Beide Bestandteile sind in den Synaptosomen enthalten, die in dieser Arbeit des öfteren erwähnt werden. Die Synaptosomen entstehen dadurch, daß bei der Homogenisation von Nerven oder von Gehirn die Nervenendigungen von den Axonen abbrechen und sich sofort wieder verschließen.

Als weitere Membranen, die sich nach der ersten Zentrifugation im Präzipitat befinden, wurden die Mitochondrien-

membranen neben anderen Membranen IR-spektroskopisch charakterisiert.

6.1.4 Mitochondrien (Vgl. Abb. 34)

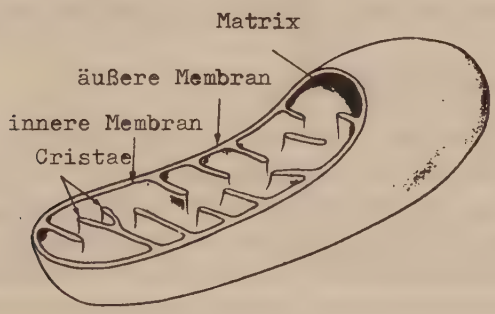


Abb. 34: Schematischer Querschnitt durch ein Mitochondrium (Aus: Lehninger, A.L. : Bioenergetik, Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1974))

Mitochondrien sind im Cytoplasma befindliche Organellen, die zwei Membranen besitzen. Die beiden Membranen sind die äußere Membran oder Hüllmembran und die innere Membran. Die zahlreichen Ausstülpungen der inneren sind entweder die Cristae oder die Tubuli. Von diesen treten die Tubuli seltener auf. Das Innere des Mitochondriums wird von der Matrix ausgefüllt.

Die Funktion der Mitochondrien im Organismus ist der Abbau von Nährstoffen und die Speicherung der Energie in Form von ATP. Dabei erfüllt die innere Membran eine wichtigere Funktion als die äußere Membran. Denn auf ihr sind eine große Anzahl der Enzyme verankert, die an den metabolischen Prozessen beteiligt sind, die in den Mitochondrien stattfinden (112). Diese Tatsache wird insbesondere dadurch deutlich, daß die innere Membran mit einem Proteingehalt von ca. 70% weit mehr Proteine als die äußere Membran enthält (113).

Als erstes soll eine Vorstellung davon vermittelt werden, wie sich bei den Membranen aus Rattenhirn der Verlauf der Amid-I-Bande bei einer Konformationsumwandlung zur ß-Struktur ändern kann.

6.2 Veränderung der Amid-I-Bande bei Zunahme von ß-Struktur

6.2.1 Durchgeführte Meßreihen

Den Versuchen von Wallach et al. (39,40) zufolge induziert eine starke pH-Wert-Erniedrigung bei einem Teil von Membranproteinen eine irreversible Umwandlung zur ß-Struktur. In den Versuchen, bei denen Wallach diese Ergebnisse erhielt, wurden die pH-Werte auf < 2,0 erniedrigt. Diese Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit verwertet. Nicht osmotisch geschockte Membranen* der Gradientenbereiche 0,9-1,0, 1,0-1,1 und 1,1-1,2 M S wurden nach den Dialysen gegen 1. Tris-EDTA-, 2. K^+-Kakodylat-Puffer, pH 7,4, gegen einen K^+-Kakodylat-Puffer, pH 1,7, dialysiert. Aus dem Vergleich der Amid-I-Banden bei den beiden pH-Werten sollte eine Schlußfolgerung gezogen werden, wie sich der Verlauf der Amid-I-Bande bei einer Konformationsumwandlung verändert.

6.2.2 Resultate (Abb. 35 a-d)

Die Maxima der Amid-I-Banden der Membranen aus den weniger dichten Gradientenbereichen verschieben sich zu kleinen Wellenzahlen. Bei den Membranen aus dem dichtesten Gradientenbereich verändert sich die Lage des Maximums zwar nicht, aber die Bande verbreitert sich bei kleinen Wellenzahlen erheblich. Eine Schulter bei 1682 cm^{-1} liegt bei beiden pH-Werten vor. Sie läßt auf das Vorhandensein von antiparalleler ß-Struktur bei den beiden pH-Werten schließen. Durch das Übereinanderlegen der Abbildungen b und d wird ersichtlich, daß die Veränderungen selbst bei Membranen

---

* Diese Membranen wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor gewonnen.

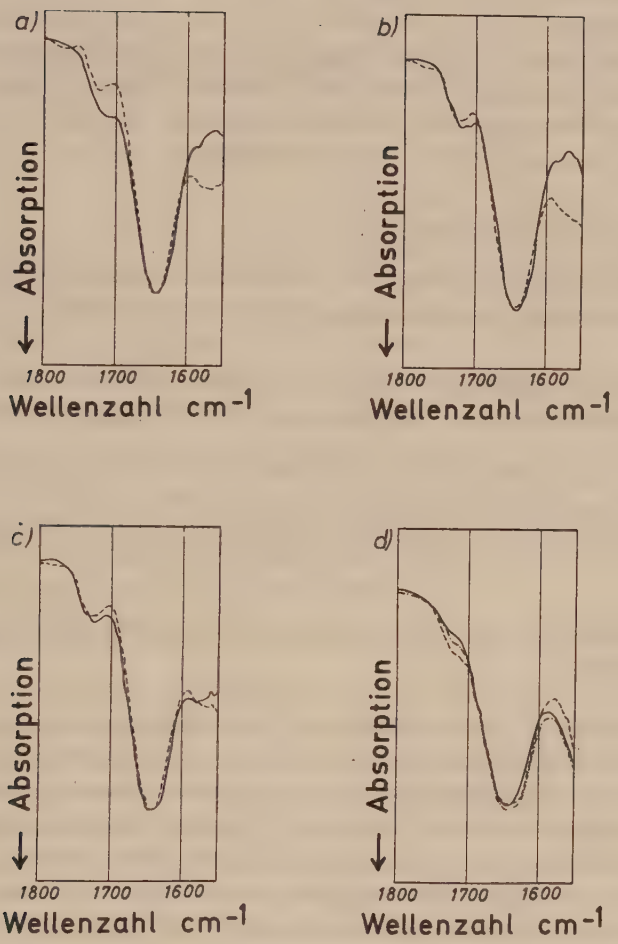


Abb. 35a-c: K^+-Membranen bei pH 7,4 und pH 1,7
a: Gradientenbereich 0,9-1,0 M S
b: Gradientenbereich 1,0-1,1 M S
c: Gradientenbereich >1,1 M S, --- pH 7,4, —— pH 1,7

Abb. 35d : K^+-Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S bei 1. pH 7,4, 2. pH 1,7, 3. pH 7,4
—— pH 7,4, --- pH 1,7, -·-·- pH 7,4 (Rückdialyse)

des gleichen Gradientenbereichs sehr unterschiedlich sein können. Man sieht ,daß im Spektrum d die Verbreiterung erheblich kräftiger als im Spektrum 35 b ist. Als zusätzliche Information liefert die Abb. 35 d, daß die bei niedrigem pH-Wert stattgefundenen Konformationsumwandlungen irreversibel sind. Denn nach der Rückdialyse gegen den pH 7,4-Puffer bleibt der Verlauf der Bande unverändert.

6.2.3 Diskussion der Resultate

Die Umfaltung von Proteinen zur ß-Struktur kann zu verschiedenen Veränderungen an der Amid-I-Bande führen:

1. Das Maximum verschiebt sich zu kleinen Wellenzahlen.
2. Die Unsymmetrie der Bande bei kleinen Wellenzahlen nimmt zu.
3. Die Bande verbreitert sich beidseitig, wobei die Verbreiterung bei kleinen Wellenzahlen größer ist.
4. Es kann auch eine Kombination dieser Ergebnisse vorkommen.

6.3 Untersuchung von im Ausschwingrotor subfraktionierten Membranen

Rattenhirn wurde, wie im Abschnitt 6.2.1 beschrieben, präpariert. Die "rohe Mitochondrienfraktion" wurde mittels einer Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor subfraktioniert (Vgl. 2.6.3.6). Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit den Membranen kein osmotischer Schock durchgeführt. Das Präzipitat wurde für die Dialyse in wenigen Millilitern Saccharose aufgenommen und homogenisiert. Nach stattgefundener Dialyse wurden aus den Membransuspensionen Filme für die Messungen in der Transmissionsküvette hergestellt (Vgl. S. 23). Aus Gründen, die im Kapitel "Problematik der vorliegenen Arbeit" erörtert werden(Siehe S. 38), wurden die Membranen der verschiedenen Subfraktionen hauptsächlich in Gegenwart von K^+-Ionen untersucht. Es sollte herausgefunden werden, in welchem Gradientenbereich Membranen vor-

liegen, deren Proteine in Gegenwart von K^+-Ionen in ß-Struktur übergehen.

6.3.1 K^+-Spektren von Membranen aus verschiedenen Dichtebereichen

6.3.1.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

Für eine Meßreihe wurde frisch präpariertes Material mittels K^+-Kakodylat-Puffer, pH 7,4, mit K^+-Ionen beladen (Siehe s. 48). Es wurden Membranen der Gradientenbereiche 0,8-0,9, 1,0-1,1 und > 1,1 M S verwendet.

In einer weiteren Meßreihe wurden Membranen, die 14 Tage bei 4° C aufbewahrt waren, verwendet. Die hierbei verwendeten Membranen stammten aus den Gradientenbereichen 1,0-1,1 und > 1,1 M S.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Filme der Membranen der Gradientenbereiche 1,0-1,1, > 1,1 M S und des Präzipitates scharf über $CaCl_2$ getrocknet.

(ii) In D_2O

Membranen der Dichtebereiche 1,0-1,1, > 1,1 M S der rohen Mitochondrienfraktion und des Präzipitates * wurden nach beendeter Dialyse wie auf Seite 48 beschrieben deuteriert. Die Deuterierung wurde so häufig durchgeführt, bis sich anhand der Banden der H_2O- und D_2O-Valenzschwingung erkennen ließ, daß der H_2O-D_2O-Austausch optimal war. Ebenso wie bei den hydratisierten Membranen wurde auch bei den deuterierten Membranen der Gradientenbereiche 1,0-1,1, > 1,1 und des Präzipitates der Einfluß des scharfen Trocknens auf den Verlauf der Banden im Wellenzahlenbereich 1800-1650 cm^{-1} untersucht.

---

* Zum Präzipitat Vgl. S. 30

6.3.1.2 Resultate

(i) In H_2O

a) Resultate mit frischen Membranen (Abb. 36a, Tab. A 6)

Für die Membranen aus den beiden höheren Dichtebereichen ist die Bande der C=O-Valenzschwingung viel stärker als für die Membranen aus dem Dichtebereich 0,8-0,9 M S. Desgleichen sind deren Amid-I-Banden an der niederfrequenten Seite stark unsymmetrisch. Die Unsymmetrie des Maximums bei 1648 cm^{-1} befindet sich bei 1632 cm^{-1}. Sie ist für die Membranen >1,1 M S ausgeprägter als für die Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S.

Während die Amid-II-Bande der Membranen von 0,8-0,9 M S eine Schulter bei 1528 cm^{-1} besitzt, sind die Banden der Membranen aus den anderen Dichtebereichen an der niederfrequenten Seite stark verbreitert.

Die Intensitäten der Bande der CH_2-Deformationsschwingung in den Spektren der Membranen der Gradientenbereiche 0,8-0,9 und 1,0-1,1 MS - bei den Membranen des dichteren

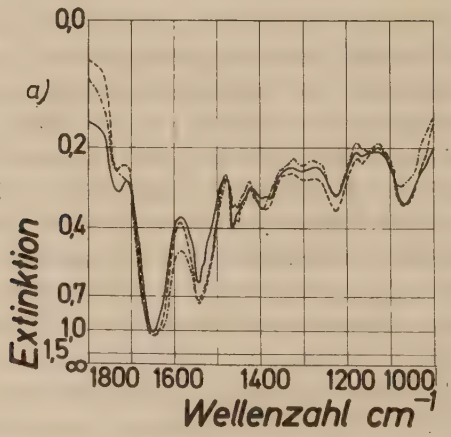


Abb. 36 a: Spektren von K^+-Membranen der Fraktionen 0,8-0,9, 1,0-1,1 und >1,1 M S. Die Spektren wurden mittels des Transmissionsverfahrens aufgenommen. —— 0,8-0,9 M S, --- 1,0-1,1 M S, -·-·- >1,1 M S

Gradientenbereichs zusätzlich die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung - sind viel höher als im Spektrum der Membranen des dichtesten Gradientenbereichs. Die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung ist im Spektrum der Membranen des Bereichs 0,8-0,9 nur als Schulter angedeutet.

Statt dessen besitzt nur das Spektrum dieser Membranfraktion eine Bande der CH_3-symmetrischen Deformationsschwingung. Sie befindet sich bei 1367 cm^{-1}. Gegenüber den Banden der anderen Fraktionen ist im Spektrum der Membranen des dichtesten Gradientenbereichs die Bande der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung zu niedrigeren und die der P=O-Valenzschwingung zu höheren Wellenzahlen verschoben (Vgl. Tab. A 6).

b) Resultate mit 14 Tage lang gelagerten Membranen (Abb. 36 b)

Es soll hier nur der Wellenzahlenbereich 1800-1650 cm^{-1} betrachtet werden. Die Banden der C=O-Valenzschwingung - in den Spektren der Membranen aus den Gradientenbereichen 1,0-1,1 und -·-·- > 1,1 M S - sind bei den 14 Tage lang gelagerten Membranen weniger intensiv als bei den frischen Membranen. Ferner haben sich die Maxima der Amid-I-Banden von 1648 cm^{-1} (frische Membranen) nach 1655 cm^{-1} verschoben.

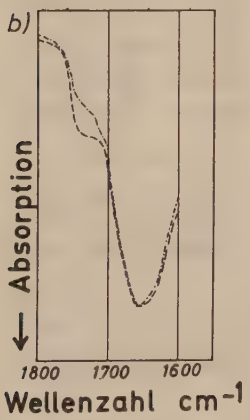


Abb. 36 b: Spektren von K^+-Membranen, die 14 Tage lang bei 4° C gelagert wurden.
--- 1,0-1,1 M S
-·-·- > 1,1 M S

Im Vergleich zu den Amid-I-Banden der frischen Membranen hat sich bei den gelaterten Membranen die Amid-I-Bande der Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S gegenüber der des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S an der niederfrequenten Seite verschmälert. Die Schulter bei 1632 cm^{-1} bleibt dabei erhalten.

c) Resultate mit den scharf getrockneten Membranen (37 a-c)

Im Spektrum der Membranen des Bereichs 1,0-1,1 M S ändert sich nichts an der Amid-I-Bande, die sich bei 1650 cm^{-1} befindet. Desgleichen ist auch kein Einfluß auf die Bande der C=O-Valenzschwingung ersichtlich.

Auch bei den Membranen aus dem Dichtebereich > 1,1 M S ändert sich durch das Trocknen nichts an der Bande der C=O-Valenzschwingung. Dagegen wird die Amid-I-Bande, die ein Maximum bei 1655 cm^{-1} und Schultern bei 1645 sowie 1690 cm^{-1} besitzt, an der niederfrequenten Seite schmäler. Gleichzeitig verschwindet die Schulter bei 1645 cm^{-1}. An der Schulter bei 1690 cm^{-1} macht sich keine Veränderung bemerkbar.

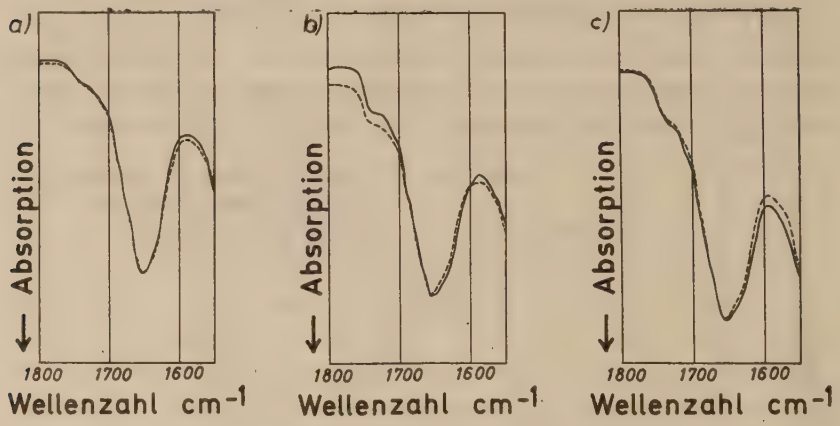


Abb. 37a-c: Spektren von K^+-Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen bei 90% Feuchtigkeit und nach dem Trocknen über $CaCl_2$. In allen Fällen gilt: —— 90 % Feuchtigkeit, ---- scharf getrocknet
a: 1,0-1,1 M S
b: >1,1 M S
c: Mitochondrien (Präzipitat)

Die Amid-I-Bande des Präzipitates, die bei 90% Feuchtigkeit zwischen 1650-1655 cm^{-1} verläuft, befindet sich nach dem Trocknen bei 1655 cm^{-1}. Gleichzeitig tritt auch eine Verschmälerung der Bande an der niederfrequenten Seite ein. Die Bande der C=O-Valenzschwingung erfährt keine Veränderung.

(ii) In D_2O (Abb 38 a,b, Tab. 6)

a) Aufnahme mit frischen nicht getrockneten Membranen

Alle Amid-I-Banden bis auf diejenige der Fraktion P_2* besitzen Schultern zwischen 1682-1685 cm^{-1}. Während die Amid-I-Bande der Membranen des Bereichs 1,0-1,1 M S ein Maximum bei 1650 cm^{-1} mit einer Unsymmetrie bei 1635 cm^{-1} besitzt, liegt das Bandenmaximum des Bereichs > 1,1 M S bei 1642 cm^{-1}. Dabei weist die Bande eine Schulter bei 1685 cm^{-1} auf. Die Amid-I-Banden der eben erwähnten Dichtebereiche verlaufen bis auf die Schultern an der niederfrequenten Seite analog. Sehr unterschiedlich hiervon ist der Bandenverlauf in den Spektren von P_2 und den Mitochondrien. Die Bande im Spektrum von P_2 liegt bei 1655 cm^{-1}. Dagegen verläuft das Absorptionsmaximum der Bande im Spektrum der Mitochondrien zwischen 1630-1655 cm^{-1}. Durch den Entzug von Wasser (bis auf 60%) und erneutes Deuterieren (90%) konnte keine Änderung des Bandenverlaufs bewirkt werden. Auch nach dem Wiederholen dieser Prozedur änderte sich nichts.

Die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung ist in den Spektren aller Membranen außer in dem Spektrum der Fraktion P_2 freigelegt.

Sehr große Unterschiede bestehen auch im Wellenzahlenbereich zwischen 1500-1400 cm^{-1}. Im Spektrum der Membranen aus dem Dichtebereich 1,0-1,1 M S überdeckt die bei 1445 cm^{-1} befindliche Bande (HDO-Scherenschwingung und Amid-II') Schultern, die in den Spektren der anderen Membranen freigelegt sind. Die bei 1450 cm^{-1} liegenden Maxima in den Spektren der Membranen des Präzipitates und des Gradientenbereichs > 1,1 M S sowie das bei 1452 cm^{-1} liegende Maximum der Membranen der Fraktion P_2 weisen Unsymmetrien bei

---

*Vgl. S. 27 und 30

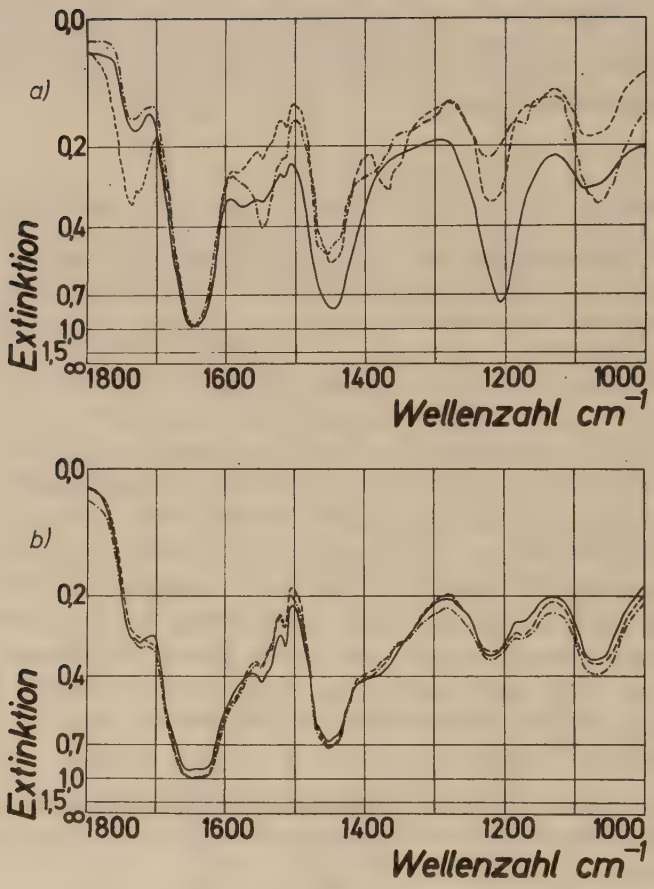


Abb. 38a,b: Spektren von deuterierten K^+-Membranen aus verschiedenen Fraktionen
a: —— 1,0-1,1 MS, ---> 1,1 M S, -·-·-· P_2
b: —— Mitochondrien, die genauso behandelt waren wie die Membranen der anderen Fraktionen
--- die gleichen Filme, die nochmals getrocknet (60%) und wiederum auf 90% Feuchtigkeit gebracht wurden.
-·- die gleichen Filme nach erneutem Trocknen und Deuterieren.

bei 1432 und 1467 cm^{-1} auf*. Wie man den Spektren entnehmen kann , ist bei den Membranen des Präzipitates und des Gradientenbereichs > 1,1 M S die Extinktion der niederfrequenten Schulter größer als die der höherfrequenten Schulter. Bei den Membranen von P_2 liegt der umgekehrte Sachverhalt vor.

Auch im Wellenzahlenbereich 1400-1300 cm^{-1} unterscheiden sich die Spektren der verschiedenen Membranfraktionen sehr stark. So weisen nur die Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S eine mittelintensive Bande der CH_2-Torsionsschwingung bei 1365 cm^{-1} auf. An dieser Bande ist eine Schulter bei 1345 cm^{-1} ausgeprägt. Im Spektrum der Membranen der "Rohen Mitochondrienfraktion" P_2 erstreckt sich statt dessen eine Bande zwischen 1415-1365 cm^{-1}. Im Spektrum der Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S werden die Banden des eben genannten Wellenzahlbereichs von der bei 1445 cm^{-1} liegenden Bande überlagert.

Ausgeprägte Banden der C-O-C- symmetrischen Valenzschwingung zeigen nur die Spektren von P_2 und vom Präzipitat.

Die Bande der D_2O-Scherenschwingung liegt nur im Spektrum der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S bei 1207 cm^{-1}. Die Spektren der übrigen Membranfraktion weisen die die Bande bei 1220 cm^{-1} auf.

b) Resultate mit den scharf getrockneten Membranen (Abb. 39 a-c)

Nach dem Trocknen tritt an der sich bei 1650 cm^{-1} befindlichen Amid-I-Bande der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S keine Änderung ein. Dagegen nimmt die Intensität der Bande der C=O-Valenzschwingung ab (Abb. 39 a). Das Trocknen der Filme von den Membranen > 1,1 M S bewirkt eine beidseitige Verschmälerung der Amid-I-Bande. Dadurch tritt das Maximum der Bande der C=O-Valenzschwingung klar hervor. Eine Intensitätsveränderung ist damit aber nicht

---

* Die Schulter bei 1467 cm^{-1} ist der Bande der CH_3-Deformationsschwingung zuzuordnen. Die Schulter bei 1432 cm^{-1} dürfte einer CH_2-Deformationsschwingung - bei CH_2-Gruppen in Nachbarschaft einer Doppelbindung - zuzuordnen sein.

verbunden. Ansonsten bleiben eine Schulter bei 1690 cm^{-1} und die Lage des Maximums bei 1650 cm^{-1} erhalten. Die Schulter bei 1630 cm^{-1} wird dabei etwas schwächer.

Bei den Mitochondrien dagegen nimmt einerseits die Intensität der Bande der C=O-Valenzschwingung ab, andererseits ververschiebt sich die Amid-I-Bande um 5 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen. Gleichzeitig erhöht sich die Absorption bei 1660 cm^{-1} relativ zu Absorption bei 1635 cm^{-1}. An der Schulter bei 1690 cm^{-1} verändert sich nach dem Trocknen nichts.

6.3.1.3 Diskussion der Resultate

Im wesentlichen geht aus den Spektren der hydratisierten K^+-Membranen hervor, daß die Membranen des Dichtebereichs 1,0-1,1 und > 1,1 M S Proteine sowohl in α-und/oder Zufallsknäuel- als auch in Faltblattstruktur enthalten. Die schwache Schul-

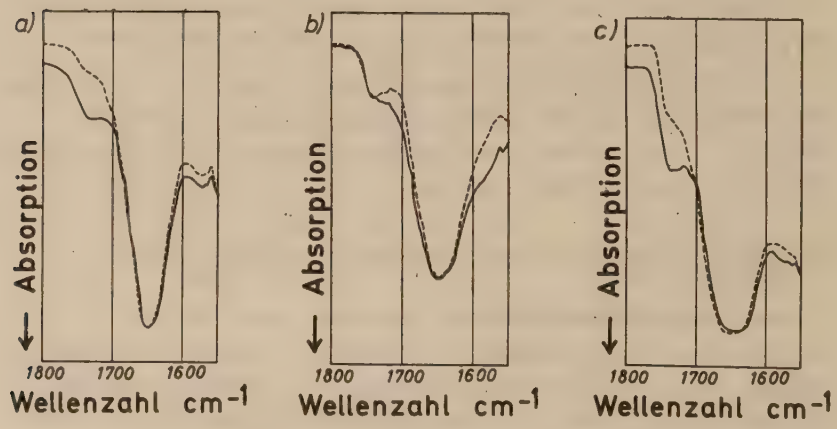


Abb. 39 a-c: Spektren von deuterierten K^+-Membranen aus verschiednen Gradientenbereichen bei 90% Feuchtigkeit und nach scharfem Trocknen über $CaCl_2$. In allen Fällen gilt: —— 90% Feuchtigkeit, --- scharf getrocknet

a: 1,0-1,1 M S
b: > 1,1 M S
c: Mitochondrien

ter bei 1690 cm^{-1} deutet auf das Vorhandensein antiparalleler Faltblattstruktur hin. Die anderen Unterschiede im Wellenzahlenbereich 1800-1000 cm^{-1} sind der verschiedenen Lipidzusammensetzung der Membranen aus den oben erwähnten Gradientenbereichen zuzuschreiben.

Die Spektren der Membranen, die 14 Tage lang bei 4° C aufbewahrt wurden, lassen aufgrund der Verschiebung der Amid-I-Banden von 1648 cm^{-1} nach 1655 cm^{-1} auf eine Konformationsumwandlung der Proteine in den Membranen der beiden verwendeten Fraktionen (1,0-1,1; > 1,1 M S) schließen. Da sich die Bandenbreite der Membranen des Dichtebereichs > 1,1 M S mehr als die Bandenbreite der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S an der niederfrequenten Seite verschmälert hat, kann die folgende Schlußfolgerung gezogen werden:

Die Membranen der Fraktion > 1,1 M S enthalten im Vergleich zu den Membranen der Fraktion 1,0-1,1 M S mehr Proteine, bei denen durch längere Lagerdauer eine Konformationsumwandlung herbeigeführt wird.

Das Trocknen bewirkt nur bei den Membranen der Fraktion >1,1 und des Präzipitates eine Strukturveränderung. Dieses ist aus dem Verschwinden der Schultern und der Verschmälerung der Amid-I-Banden an der niederfrequenten Seite ersichtlich. Daß die Verschmälerung nicht auf die Dehydratisierung zurückzuführen ist, kann der Abb. 37 a entnommen werden. Die Abb. zeigt, daß sich die Bandenbreite bei den Membranen der Fraktion 1,0-1,1 M S nicht durch das Trocknen verändert hat.

Aus den Spektren der deuterierten K^+-Membranen geht hervor, daß in der "rohen Mitochondrienfraktion" P_2 der H_2O-D_2O-Austausch besonders langsam stattfindet. Diese Schlußfolgerung kann aus der großen Intensität der Amid-II-Bande gezogen werden (Abb. 38 a).

Zum H_2O-D_2O-Austausch schreiben Timasheff et al. (48), daß bei einem langsamen H-D-Austausch auf die Kompaktheit

des nativen Proteins zu schließen ist. Blout et al. nehmen an, daß der langsame Austausch auf hydrophobe Regionen zurückzuführen ist. Somit dürften die Proteine in der "rohen Mitochondrienfraktion" entweder kompakter oder in einer hydrophoberen Umgebung sein, als es bei den durch Subfraktionierung getrennten Membranen der Fall ist.

Von besonderem Interesse dürfte sein, daß die "rohe Mitochondrienfraktion" keine ß-Struktur aufzuweisen scheint, obwohl die Membranfraktionen, die durch deren Subfraktionierung gewonnen wurden, Proteine in ß-Struktur besitzen. Auffällig ist vor allem der Unterschied zwischen den Amid-I-Banden der "rohen Mitochondrienfraktion" und den Membranen des Präzipitates.

Der Mangel an ß-Struktur in der Fraktion P_2 könnte darauf zurückgeführt werden, daß je mehr Arbeitsgänge mit Membranen stattfinden, desto eher Konformationsumwandlungen stattfinden können.

Was die Amid-I-Bande der deuterierten Mitochondrien anbetrifft, so zeigt sie ein verbreitertes Maximum mit den höchsten Intensitäten bei 1630 und 1655 cm^{-1}. Da die Intensitäten der beiden Maxima gleich groß sind, müssen bei den Membranen dieser Fraktion die gleichen Anteile von α- und/oder Zufallsknäuel- und antiparalleler ß-Struktur vorliegen. Ausserdem läßt der Verlauf des Maximums darauf schließen, daß einige Proteine auch in anderen Konformationen vorliegen.

Daß Mitochondrien sehr viel ß-strukturierte Proteine enthalten, bewiesen Wallach et al. (27) sowie Graham et al. (29). Nachdem sich in dem untersuchten Präzipitat neben den Mitochondrien sicherlich auch viele andere Membranfragmente befinden (Vgl. S. 30), deren Proteine andere Proteinstrukturen als die Mitochondrien aufweisen könnten, ist es plausibel, daß das Maximum der Amid-I-Bande einen derartigen Verlauf hat (Vgl. Abb. 38 b).

Beim Vergleich der H_2O- und D_2O-Spektren der Abbildungen 37,39 c ist der Unterschied an der Amid-I-Bande der Membranen des Präzipitates besonders auffällig. Zunächst fällt auf, daß das Maximum der deuterierten Membranen stark verbreitert ist. Außerdem ist die Bande der deuterierten gegenüber der der hydratisierten Membranen stark verbreitert. Letzterer Sachverhalt liegt auch bei den Membranen aus der Fraktion > 1,1 M S vor. Diese Ergebnisse lassen folgenden Schluß zu:

In den deuterierten Membranen des Präzipitates und des Gradientenbereichs > 1,1 M S liegen mehr Proteine in ß-Struktur vor, als es bei den hydratisierten Membranen der Fall ist.

Zwischen den Amid-I-Banden der hydratisierten und deuterierten Membranen des Dichtebereichs 1,0-1,1 M S gibt es nur geringfügige Unterschiede. Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden:

Die Membranen des Dichtebereichs 1,0-1,1 M S besitzen weniger Proteine als die anderen Membranen, die sich in Gegenwart von D_2O zur ß-Struktur umfalten.

Auch die Spektren der scharf getrockneten Filme lassen erkennen, daß die Membranen aus dem Dichtebereich > 1,1 sowie aus dem Präzipitat mehr Proteine in ß-Konformation enthalten als die Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S (Vgl. die Spektren der Abbildungen 37 und 39).

Wie jedoch die durch das Trocknen bedingte Verschiebung der Amid-I-Banden zu höheren Wellenzahlen in den Spektren der Membranen aus den beiden dichteren Fraktionen zeigt, scheinen sich etliche ß-strukturierte Proteine aufgrund der Dehydratisierung zu entfalten (Nach Fasman (73) ist es angemessen zu sagen "entfalten", wenn die exakte physikalische Natur der Konformationsumwandlung nicht bekannt ist).

6.3.2. Kationenabhängigkeit von Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen bei pH- bzw. pD 7,4

6.3.2.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

Es wurden Na^+- und K^+-Membranen des Präzipitates und des Gradientenbereichs > 1,1 M S untersucht. Mit den Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S wurde zusätzlich untersucht, wie sich die Spektren lysierter von denen nicht lysierter Membranen unterscheiden.

Hierzu wurden Spektren aufgenommen von:

lysierten K^+- und Na^+- sowie von nicht lysierten K^+-Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S.

Die Membranen des Präzipitates waren nicht osmotisch geschockt.*

(ii) In D_2O

Es wurden Spektren von nicht lysierten K^+- und Na^+-Mitochondrien aufgenommen. Für die Aufnahme der Spektren von Membranen aus dem Gradientenbereich > 1,1 M S wurden lysierte K^+- und Na^+-Membranen sowie nicht lysierte K^+-Membranen verwendet.

6.3.2.2 Resultate

(i) In H_2O

a) Spektren von den Mitochondrien (Abb. 40 a, Tab A 7)

Die Amid-I-Bande der K^+- gegenüber den Na^+-Filmen ist beidseitig verbreitert . Die Bande der K^+-Filme besitzt zwei Maxima bei 1647 und 1655 cm^{-1}, während die der Na^+-Filme nur ein Maximum bei 1652 cm^{-1} besitzt. Außerdem besitzt nur das Spektrum der K^+-Membranen eine Schulter bei 1687 cm^{-1}

---

*Leider konnte mangels Materials keine größere Meßreihe zu dem Thema gemacht werden, wie ein durchgeführter und nicht durchgeführter osmotischer Schock Einfluß auf den Spektrenverlauf nimmt.

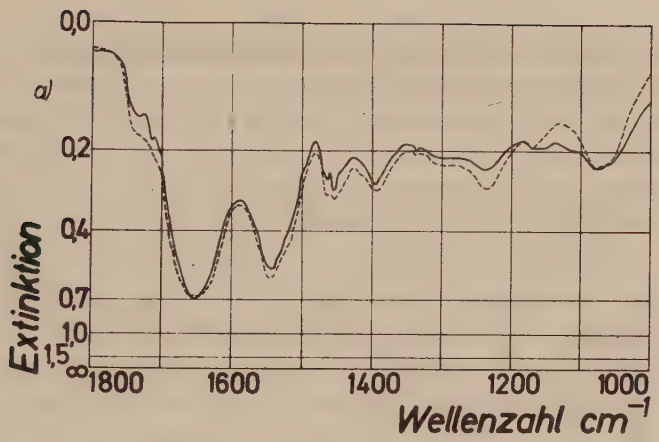


Abb. 40 a: Spektren von K^+- und Na^+-Mitochondrien, die nicht lysiert wurden. —— Na^+, --- K^+

Das Absorptionsmaximum der Amid-II-Bande bei 1542 cm^{-1} besitzt mit Na^+ zwei Unsymmetrien bei 1557 und 1532 cm^{-1}. Mit K^+ weist die Amid-II-Bande, welche sich bei 1545 cm^{-1} befindet, Schultern bei 1562 und 1515 cm^{-1} auf.

Mit K^+ liegt die Bande der CH_2-Deformationsschwingung bei höheren und die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung bei niedrigeren Wellenzahlen als mit Na^+. Außerdem besitzt die Bande der CH_2-Deformationsschwingung mit K^+ eine geringere Intensität als mit Na^+. Die Unterschiede dürften durch die verschieden großen elektrischen Felder der Kationen bedingt sein.

Mit beiden Kationen besitzen die Spektren eine Bande bei 1337 cm^{-1}. Diese Bande dürfte einer der Banden zuzuordnen sein, die durch die Kopplung der O-H-Deformationsschwingung und der C-O-Valenzschwingung der COOH-Gruppe entstehen (129).

Im Bereich der Bande der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung unterscheiden sich die Spektren der K^+- und Na^+ erheblich. Während im K^+-Spektrum nur eine Bande bei 1170 cm^{-1} vorliegt, weist das Na^+-Spektrum eine Bande mit einem Maximum zwischen 1168-1152 cm^{-1} auf.

b) Spektren der Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S (Abb. 40 b, Tab. A 7)

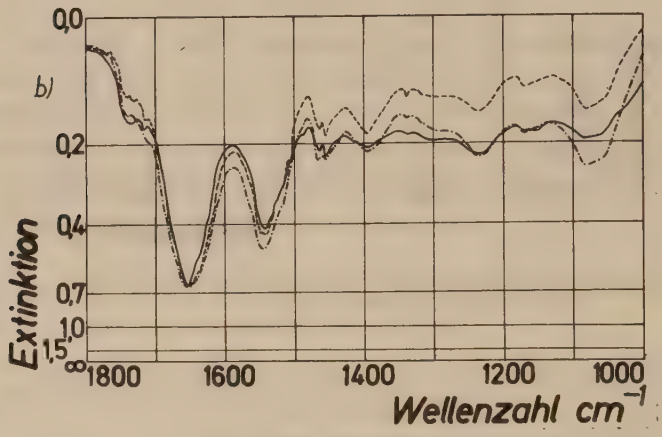


Abb. 40 b: Spektren von K^+- und Na^+-Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 nach dem osmotischen Schock und Spektrum von K^+-Membranen ohne osmotischen Schock.
—— Na^+, --- K^+, -·-·- K^+ ohne osmotischen Schock

Das Maximum der Amid-I-Bande befindet sich in allen Spektren bei 1652 cm^{-1}. Der Vergleich der Spektren der osmotisch geschockten Membranen zeigt, daß die Amid-I-Bande mit K^+ gegenüber der Amid-I-Bande mit Na^+ an der niederfrequenten Seite stark verbreitert ist. Mit beiden Kationen ist eine Schulter bei 1635 cm^{-1} zu beobachten; sie ist im K^+-Spektrum ausgeprägter als im Na^+-Spektrum. Beidseitig verbreitert gegenüber den Banden der lysierten Membranen ist die Amid-I-Bande der nicht osmotisch geschockten K^+-Membranen. Außerdem ist die Unsymmetrie bei niedrigen Wellenzahlen am höchsten.

Bei den osmotisch geschockten Membranen liegen sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ bei 1528 und 1515 cm^{-1} Schultern an der Amid-II-Bande vor. Die Bande der K^+-Membranen ist im Gegensatz zur Bande der Na^+-Membranen in zwei Maxima aufgespalten.

Diese befinden sich bei 1542 und 1548 cm^{-1}. Die Amid-I-Bande der Na^+-Membranen besitzt ein Maximum bei 1540 cm^{-1}. Im Spektrum der nicht lysierten K^+-Membranen liegt das Maximum der Bande bei 1545 cm^{-1} und weist zusätzlich eine Schulter bei bei 1566 cm^{-1} auf. Allen drei Spektren ist eine schwache Schulter bei 1515 cm^{-1} gemeinsam, die dem N-H-Übergangsmoment parallel zur Helixachse zuzuordnen ist.

Während bei den Na^+- als auch den K^+-Membranen, die keiner Lysis unterworfen wurden, die Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung intensiver als die der CH_2-Deformationsschwingung ist, verhält sich dieser Fall bei den lysierten Membranen umgekehrt.

Vom übrigen Wellenzahlenbereich ist die Bande der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung erwähnenswert. Wie bei den Membranen des Präzipitates weist nur das Na^+-Spektrum eine Doppelbande auf. Die Maxima befinden sich bei 1168 und 1152 cm^{-1}.

(ii) In D_2O

a) Mitochondrien (Vgl. Abb. 41 a, Tab. A 7)

Die Amid-I-Bande der K^+-Membranen besitzt ein Maximum, welches sich bei 1640 cm^{-1} befindet; damit liegt die Bande um 15 Wellenzahlen niedriger als im Na^+-Spektrum. Mit K^+ besitzt die Bande eine Unsymmetrie bei 1632 cm^{-1} und zusätzlich eine Schulter bei 1690 cm^{-1}. Die Amid-I-Bande der Na^+-Membranen weist ebenfalls die höherfrequente Schulter bei 1690 cm^{-1} auf. Die niederfrequente Schulter befindet sich bei 1635 cm^{-1}.

Bezüglich des Wellenzahlenbereichs 1600-1500 cm^{-1} unterscheiden sich die Spektren wie folgt: Eine Bande, die sich mit K^+ bei 1512 cm^{-1} befindet, liegt mit Na^+ bei 1515 cm^{-1}. Im Spektrum der Na^+-Membranen ist die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung durch die intensive Amid-II-Bande bei 1545 cm^{-1} verdeckt. Da die Amid-II-Bande in den K^+-Spektren eine wesentlich geringere Intensität als im Na^+-Spektrum besitzt, tritt in den K^+-Spektren die Bande der CO_2^--

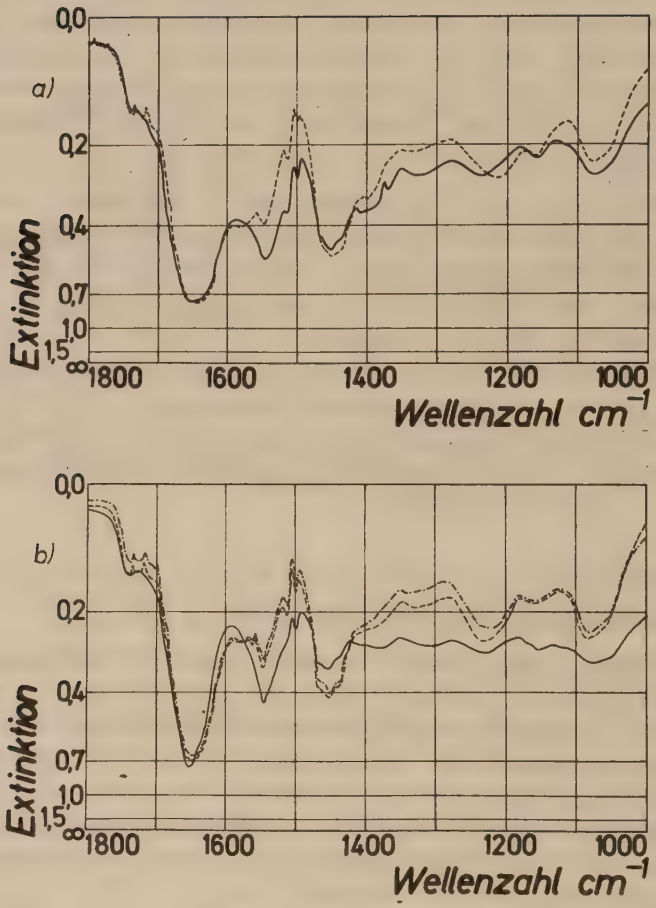


Abb. 41a: Spektren von K^+- und Na^+-Mitochondrien, die nicht lysiert wurden.
—— Na^+, --- K^+

41b: Spektren von K^+- und Na^+-Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S nach dem osmotischen Schock und Spektrum von K^+-Membranen des gleichen Gradientenbereichs, die nicht osmotisch geschockt wurden.

—— Na^+, --- K^+, -·-·- K^+ ohne osmotischen Schock

asymmetrischen-Valenzschwingung bei 1580 cm^{-1} in Erscheinung.

Was die Bande der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung anbetrifft, so tritt deren Maximum mit K^+ deutlich bei 1395 cm^{-1} hervor. Bei den Na^+-Membranen erstreckt sich statt dessen eine Bande zwischen 1412-1372 cm^{-1}, deren Maximum nicht eindeutig festgelegt werden kann. Außerdem ist mit Na^+ die Bande der CH_2-Torsionsschwingung bei 1370 cm^{-1} deutlich ausgeprägt.

Im weiteren Wellenzahlenbereich erstreckt sich in beiden Spektren eine Bande, die auf (CH_2)-Nickschwingungen zurückzuführen ist. Eine Bande der D_2O-Scherenschwingung befindet sich nur im Spektrum der K^+-Membranen; ihr Maximum ist bei 1212 cm^{-1}. Die bei 1235 cm^{-1} liegende Bande im Na^+-Spektrum muß der P=O-Valenzschwingung zuzuordnen sein.

b) Spektren der Membranen des Gradientenbereichs > 1,1 M S (Abb 41 b, Tab. A 7)

Das Maximum der Amid-I-Bande befindet sich in den K^+-Spektren bei um 10 cm^{-1} kleineren Wellenzahlen als im Spektrum der Na^+-Membranen. Außerdem sind die Amid-I-Banden in den beiden K^+-Spektren an der niederfrequenten Seite stark verbreitert. In allen Spektren liegen Schultern vor, die auf das Vorhandensein von antiparalleler Faltblattstuktur schließen lassen. Da die Schulter bei 1690 cm^{-1} im Spektrum der Na^+-Membranen viel schwächer als die Schulter bei 1680 cm^{-1} ist, dürfte mit Na^+ viel weniger antiparallele Faltblattstruktur als mit K^+ vorliegen.

Bei den Na^+-Membranen ist der H_2O-D_2O-Austausch viel geringer als bei den K^+-Membranen. Daher überdeckt die Amid-II-Bande mit dem Maximum bei 1545 cm^{-1} den Wellenzahlenbereich zwischen 1600-1500 cm^{-1}. Mit K^+ sind im Spektrum sowohl der lysierten als auch nicht lysierten Membranen die Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung bei 1575 cm^{-1} sowie Banden bei 1560 und 1512 cm^{-1} freigelegt. Die stärkste Absorption ist im Spektrum der K^+-Membranen vor bzw. nach dem osmotischen Schock bei 1547 bzw. 1543 cm^{-1}.

Die Intensität der Bande im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} ist mit Na^+ viel geringer als mit K^+. Da die Amid-II-Bande der Na^+-Membranen auf einen geringeren H_2O-D_2O-Austausch als bei den K^+-Membranen schließen läßt, dürfte die wenig intensive Bande im Wellenzahlenbereich 1500-1440 cm^{-1}, die das Spektrum der Na^+-Membranen aufweist, auf wenig Amid-II-Anteil zurückzuführen sein.

In allen Spektren der Abb. 41 b verdeckt eine Bande, die sich zwischen 1417-1350 cm^{-1} erstreckt, die Bande der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung.

Eine Bande der D_2O-Scherenschwingung liegt in keinem Spektrum vor. Sie muß durch die Bande der P=O-Valenzschwingung verdeckt sein. Mit Na^+ befindet sich das Maximum bei 1230 cm^{-1}. Im Spektrum der K^+-Membranen, die lysiert wurden, befindet sich das Maximum bei 1235 cm^{-1}. Die nicht lysierten Membranen weisen in ihrem Spektrum eine Bande mit einem Maximum zwischen 1215-1240 cm^{-1} auf.

Die Bande der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung besitzt mit Na^+ zwei Maxima bei 1152 und 1165 cm^{-1}. In den Spektren der K^+-Membranen befindet sich ein Maximum bei 1160 cm^{-1}.

Im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} erstreckt sich in allen Spektren eine Bande zwischen 1080-1050 cm^{-1}.

6.3.2.3 Diskussion der Resultate

Auch bei den Resultaten dieser Versuchsserie wird deutlich, daß in D_2O die Bildung von ß-Struktur gefördert wird (Vgl. S. 143). Dabei üben K^+ und Na^+ einen sehr unterschiedlichen Einfluß aus, der überdies noch bei den Membranen der verschiedenen Fraktionen stark variiert. Während die Membranen des Dichtebereichs > 1,1 M S nur mit K^+ Proteine in Faltblattstuktur besitzen, induziert D_2O bei den Proteinen der Mitochondrien in Gegenwart von K^+ und auch Na^+ die Bildung von ß-Konformation. Allerdings läßt der Amid-I-Bandenverlauf darauf schließen, daß sich mit K^+ mehr Faltblattstruktur

als mit Na^+ ausbildet.

Auch bei den hydratisierten Mitochondrien liegt mit Na^+ bereits ß-Struktur vor, auch in diesem Falle weniger als mit K^+. Ansonsten dürften viele Proteine der Mitochondrienmembranen in Zwischenstrukturen vorliegen - und zwar insbesondere mit K^+.

Anders sind die Verhältnisse bei den Membranen der Fraktion > 1,1 M S. Die Amid-I-Banden der nicht lysierten als auch lysierten K^+-Membranen weisen fast den gleichen, für ß-Struktur charakteristischen Verlauf auf*. Mit Na^+ scheinen die Proteine vorwiegend in α-und/oder Zufallsknäuelstruktur vorzuliegen.

Was den H_2O-D_2O-Austausch angeht, so zeigt der Vergleich der K^+- und Na^+-Spektren der Abbildungen 41 a und b, daß der Austausch in Gegenwart von Na^+ gehemmt zu sein scheint. Wie bereits früher erwähnt, erfolgt ein Austausch von H_2O gegen D_2O bei Proteinen in Zufallsknäuelstruktur am leichtesten (106). Demnach dürften laut obiger Resultate die meisten der Proteine in Gegenwart von Na^+ in α-helikaler Konformation vorliegen. Um Zufallsknäuelkonformation kann es sich nicht handeln, da bei dieser Struktur der H_2O-D_2O-Austausch am schnellsten abläuft (106).

Unter der Einbeziehung der Resultate, die in der Literatur beschrieben werden (106), kann nun gefolgert werden:

Ein Austausch von H_2O gegen D_2O ist bei den verschiedenen Proteinkonformationen in folgender Reihenfolge begünstigt:
α-Helix → Faltblattstruktur → Zufallsknäuelstruktur

---

* Aus diesem Grunde wurde bei vielen weiteren Versuchen auf den osmotischen Schock verzichtet.

6.4 Untersuchungen von im Zonenrotor subfraktionierten Membranen

Für die meisten Meßserien wurde nur eine Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor durchgeführt, um Zeit einsparen zu können. Denn es sollten mit möglichst frischem Material Messungen durchgeführt werden. Nur für die Versuche zur Temperaturabhängigkeit wurde die Subfraktion P_2B (Vgl. S. 30) ebenfalls subfraktioniert, um dann mit der Subfraktion 0,9-1,0 M S Versuche durchzuführen.

Da die Messungen mit lysierten und nicht lysierten Membranen keine wesentlichen Unterschiede im Spektrenverlauf gezeigt hatten, wurden mit nicht lysierten Membranen aus den Subfraktionen von P_2 Experimente durchgeführt*. Die verwendeten Membranen stammten aus den Gradientenbereichen 0,9-1,0, 1,0-1,1, 1,1-1,2 und > 1,2 M S. Wenn es nicht extra vermerkt wird, erfolgten die Messungen in der FMIR-Küvette.

6.4.1 Einfluß verschiedener Ionenmilieus auf die Membranen der verschiedenen Gradientenbereiche

6.4.1.1 Durchgeführte Meßreihen

(i) In H_2O

Für die Trennung der bei diesen Versuchsserien verwendeten Membranen wurde ein diskontinuierlicher Gradient verwendet (Vgl. Abb. 14 a,b, S. 35). Von Membranen der Fraktionen 0,9-1,0; 1,0-1,1 und >1,2 MS wurden sowohl FMIR- als auch Transmissionsspektren aufgenommen. Es sollte festgestellt werden, ob und wie sich die beiden Meßverfahren und die damit verbundenen Probenvorbereitungen in dem Spektrenverlauf unterscheiden. Bei Messungen nach dem FMIR-Verfahren erfolgten in der Küvette nacheinander die Dialysen gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA, 3. K^+-Kakodylat-, 4. Na^+-Kakodylat-Puffer (Vgl. 2.7.3, S. 48). Bei Messungen nach dem Transmissionsverfahren wurde die unter 2.7.2, S 48, beschriebene

---

* Zu P_2 : Vgl. S. 27

Methode angewendet. Es wurden nur Na^+- und K^+-Filme hergestellt.

(ii) In D_2O

Für die Messungen in D_2O wurden nach einer Dichtegradientenzentrifugation nicht osmotisch geschockte Membranen der Gradientenbereiche 0,9-1,0; 1,0-1,1 sowie 1,1-1,2 M S in die FMIR-Küvette gefüllt und deuteriert (Vgl. S. 16) und anschließend gegen die verschiedenen D_2O-Puffer dialysiert. Wurden die Membranen mittels der Kakodylat-Puffer mit Kationen beladen, erfolgte stets zuerst die Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer, dann wurde nacheinander gegen 1. K^+-, 2. Na^+-, 3. Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert. Wenn der Einfluß der physiologischen Puffer auf die Membranen untersucht wurde, fand keine Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer statt. Wie bei allen Versuchen, die zur Kationenabhängigkeit durchgeführt wurden, waren die Kakodylat-Puffer und der Tris-EDTA-Puffer auf pD 7,4 und die physiologischen Lösungen auf pD 7,2 eingestellt.

6.4.1.2 Resultate

(i) In H_2O

a) Mit Tris-EDTA-, K^+-Membranen und nur gegen H_2O dialysierten Membranen (Abb. 42 und 43 a-c, Tab.A 8)

Das H_2O-Spektrum der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S zeichnet sich insbesondere durch eine im Gegensatz zu den Spektren der Tris-EDTA- und K^+-Membranen symmetrische Amid-I-Bande bei 1645 cm^{-1} aus (Abb. 43 b). In diesem Spektrum ist auffällig, daß anstatt einer Bande der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung nur die Bande der CH_2-Scherenschwingung - bei CH_2-Gruppen in Nachbarschaft einer Doppelbindung - bei 1435 cm^{-1} vorliegt.

Nach der Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer ändert sich bereits einiges im Spektrenverlauf der Membranen aus dem oben erwähnten Gradientenbereich. Nun zum Spektrum der Tris-EDTA-Membranen:

Aus den Spektren der Membranen, die gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert wurden (Abb. 42), geht hervor, daß die Membranen bereits mit Tris-EDTA-Puffer einen verschieden hohen Anteil von Proteinen in ß-Konformation enthalten. Die Membranen der Fraktion 1,0-1,1 M S besitzen mehr ß- als α- und/oder Zufallsknäuelstruktur. Bei der Fraktion 0,9-1,0 M S liegt das umgekehrte Verhältnis vor. Im Spektrum der Membranen aus der Fraktion > 1,2 M S befindet sich eine Bande, die das Maximum bei 1645 cm^{-1} besitzt. Es kann hier auf das Überwiegen von Zwischenstrukturen geschlossen werden.

Der große Anteil ß-strukturierter Proteine in den Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S macht sich auch an der Amid-II-Bande bemerkbar. Die Bande ist gegenüber den Banden der Membranen aus den anderen Gradientenbereichen stark an der niederfrequenten Seite verbreitert.

Unterschiede an den Banden der CH_3-asymmetrischen und CH_2-Deformationsschwingung sowie der CH_2-Deformationsschwin-

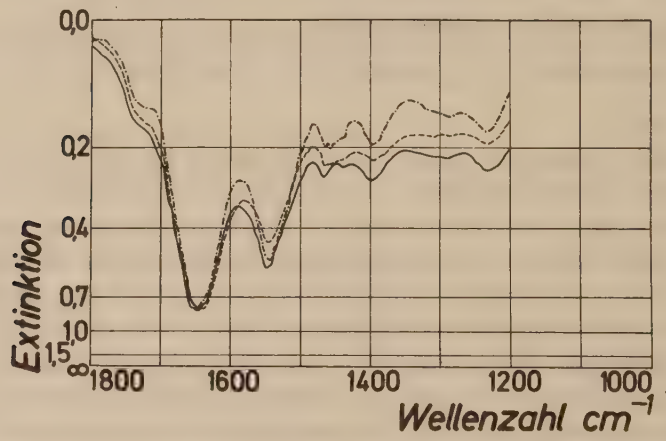


Abb. 42: Spektren von Tris-EDTA-Membranen aus verschiedenen Dichtebereichen eines Saccharosegradienten. Nach der Dialyse gegen H_2O wurde gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert. ——0,9-1,0 M S, --- 1,0-1,1 M S -·-·- > 1,2 M S

gung - bei CH_2-Gruppen in Nachbarschaft einer Doppelbindung- lassen auf eine sehr unterschiedliche Lipidzusammensetzung der untersuchten Membranen schließen (93).

Nach der Dialyse gegen K^+-Kakodylat-Puffer ändern sich die Spektren der Membranen aus den drei Gradientenbereichen sehr unterschiedlich:

Membranen des Bereichs 0,9-1,0 M S (Abb. 43 a, Tab. A 8)

Es ändert sich nur die Amid-I-Bande. Sie wird zwischen 1637-1642 cm^{-1} breiter und zwischen 1652-1660 cm^{-1} schmäler als die Bande der Tris-EDTA-Membranen. Es kann darauf geschlossen werden, daß sich einige Proteine von α- und/oder Zufallsknäuelstruktur in Gegenwart von K^+ zur Faltblattstruktur umgefaltet haben.

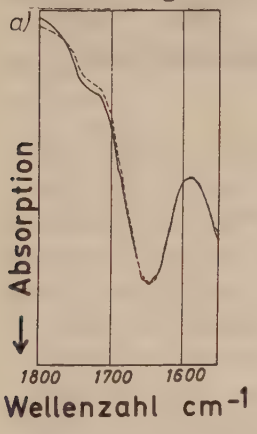


Abb. 43 a: Spektren der Tris-EDTA- und K^+-Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S. —— Tris-EDTA, --- K^+

Membranen des Bereichs 1,0-1,1 M S (Abb. 43 b)

An der Amid-I-Bande der K^+-Membranen tritt nur eine minimale Verschmälerung zwischen 1647-1655 cm^{-1} gegenüber der Bande der Tris-EDTA-Membranen auf. Eine zusätzliche Verbreiterung an der Amid-II-Bande, die an der niederfrequenten Seite zu beobachten ist, läßt auf das Entstehen von etwas mehr ß-Struktur schließen.

Membranen des Bereichs > 1,2 M S (Abb. 43 c)

Die Veränderungen an der Amid-I-Bande lassen darauf schliessen, daß bei den Membranen dieser Fraktion sehr viele Pro-

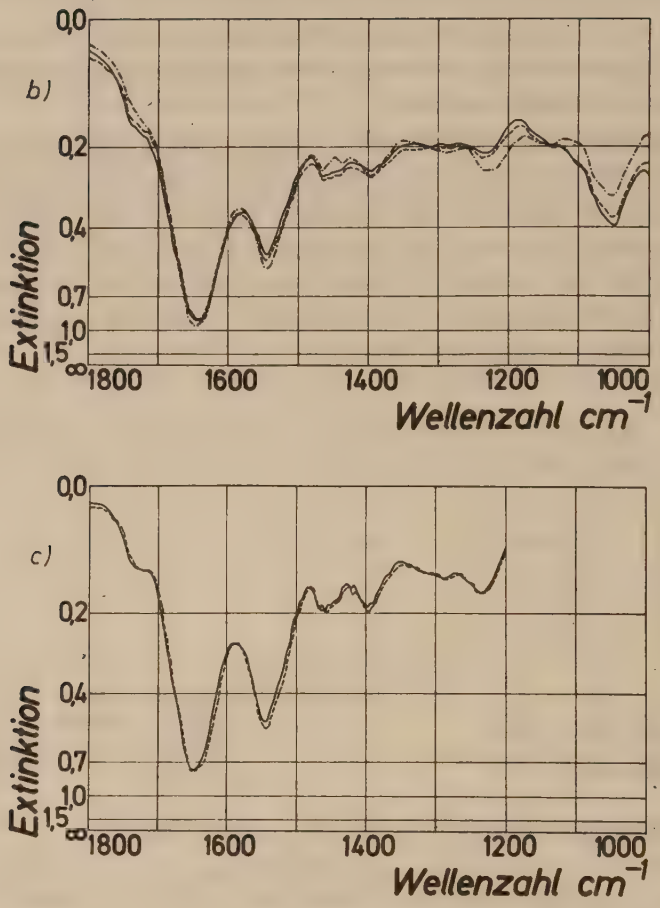


Abb. 43b,c: Spektren der Tris-EDTA- und K^+-Membranen der Gradientenbereiche 1,0-1,1 und >1,2 M S. Von den Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S ist zusätzlich das H_2O-Spektrum eingezeichnet.
b: 1,0-1,1 M S
c: >1,2 M S
—— Tris-EDTA, --- K^+, -·-·- H_2O

teine - mehr als bei anderen Membranen - in ß-Struktur übergegangen sind. Ansonsten sind keine wesentlichen Veränderungen zu erwähnen.

b) FMIR- und Transmissionsspektren von K^+- und Na^+-Membranen (Tab. A 8, A 10)

α) Spektren der Membranen aus dem Gradientenbereich 0,9-1,0 M S

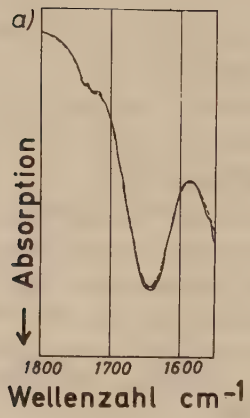
1. FMIR-Spektren(Abb. 44 a)

Zwischen den Na^+- und K^+-Spektren besteht nur ein geringfügiger Unterschied an der Amid-I-Bande. Die Amid-I-Banden besitzen jeweils ein Maximum bei 1640 cm^{-1} und eine Schulter bei 1680 cm^{-1}. Eine weitere Schulter liegt mit Na^+ bei 1630 und mit K^+ bei 1632 cm^{-1} vor. Der Bandenverlauf in den beiden Spektren legt die Vermutung nahe, daß neben etwas antiparalleler ß-Struktur vorwiegend eine Zwischenstruktur vorliegt.

2. Transmissions-Spektren(Abb. 44 b)

Bei den Transmissionsspektren befinden sich die Maxima sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ bei 1652 cm^{-1}, was auf α- und/oder Zufallsknäuelstruktur schließen läßt. Das Vorhandensein von etwas antiparalleler ß-Struktur sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ geht aus der jeweils bei 1635 und 1685 cm^{-1} vorhandenen Schultern hervor. Da die Schulter an der niederfrequenten Seite mit K^+ intensiver als mit Na^+ ist, kann gefolgert werden, daß K^+ die Bildung von etwas mehr antiparalleler ß-Struktur als Na^+ induziert.

Weitere Unterschiede zwischen den K^+- und Na^+-Spektren bestehen an der Bande der C-O-C-symmetrischen Valenzschwingung und an der Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1}. Diese Banden sind mit Na^+ breiter als mit K^+.



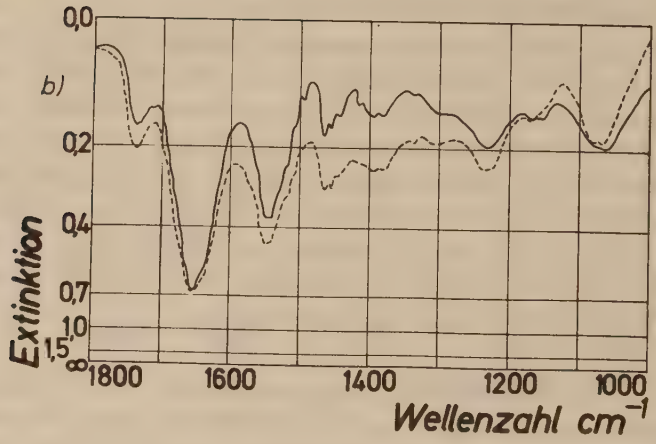


Abb. 44a,b: FMIR-und Transmissionsspektren der Na^+- und K^+-Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S
a: FMIR-Spektren
b: Transmissionsspektren
—— Na^+, --- K^+

ß) Spektren der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S

1. FMIR-Spektren (Abb. 45 a, Tab. A 8)

Bei den K^+-Membranen, die eine Amid-I-Bande bei 1637 cm^{-1} und Schultern bei 1655 und 1680 cm^{-1} besitzen, überwiegt die Faltblattstruktur (antiparallel und parallel) vor α-Helix- und/oder Zufallsknäuelstruktur. Im Spektrum der Na^+-Membranen befindet sich die Amid-I-Bande zwischen 1642-1645 cm^{-1} und besitzt eine Schulter bei 1680 cm^{-1}. Neben einem sehr geringen Anteil von antiparalleler ß-Struktur dürften Zwischenstrukturen vorliegen.

2. Transmissionsspektren (Abb. 45 b, Tab. A 8)

Die Amid-I-Bande der Na^+-Membranen befindet sich bei 1654 cm^{-1} und damit in einer Lage, die für α-Helix- und/oder Zufallsknäuelstruktur charakteristisch ist. Die K^+-Membranen lassen mit einer bei 1647 cm^{-1} liegenden Amid-I-Bande, welche Schultern bei 1631 und 1682 cm^{-1} besitzt, auf das Vorhandensein einer der seltenen Proteinstrukturen und auch von etwas antiparalleler ß-Struktur schließen. Die Unterschiede der Konformationen in Gegenwart der beiden Kationen lassen sich auch aus der Amid-II-Bande ersehen. Sie befindet sich mit K^+ bei niedrigeren Wellenzahlen als mit Na^+.

Weitere Unterschiede bestehen dahingehend, daß die Banden der CH_2-Deformationsschwingung und der P=O-Valenzschwingung mit K^+ bei niedrigeren Wellenzahlen als mit Na^+ liegen. sind.

γ) Spektren der Membranen aus dem Gradientenbereich >1,2 M S

1. FMIR-Spektren (Abb. 46 a, Tab. A 8)

Die bei 1647 cm^{-1} liegende Amid-I-Bande der K^+-Membranen läßt im Vergleich zur Bande der Na^+-Membranen, die das Maximum bei 1650 cm^{-1} besitzen, auf mehr Proteine in antiparalleler ß-Struktur schließen. Denn die Bande besitzt mit K^+ stärkere Schultern bei 1630 und 1680 cm^{-1} als mit Na^+. Ausserdem ist die Bande an der niederfrequenten Seite verbreitert.

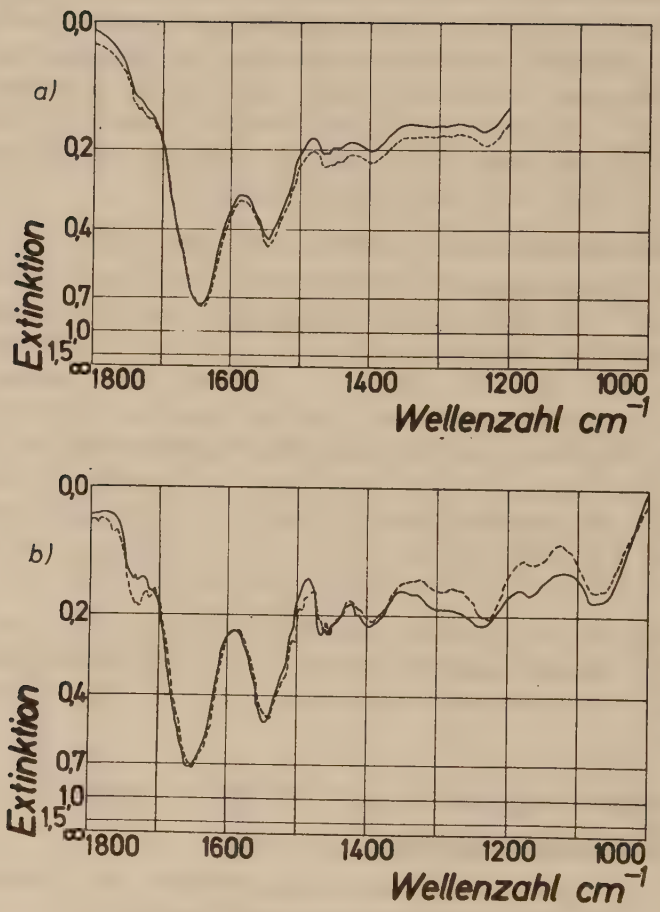


Abb. 45a,b: FMIR- und Transmissionsspektren der Na^+- und K^+-Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S
a: FMIR-Spektren
b: Transmissionsspektren
—— Na^+, --- K^+

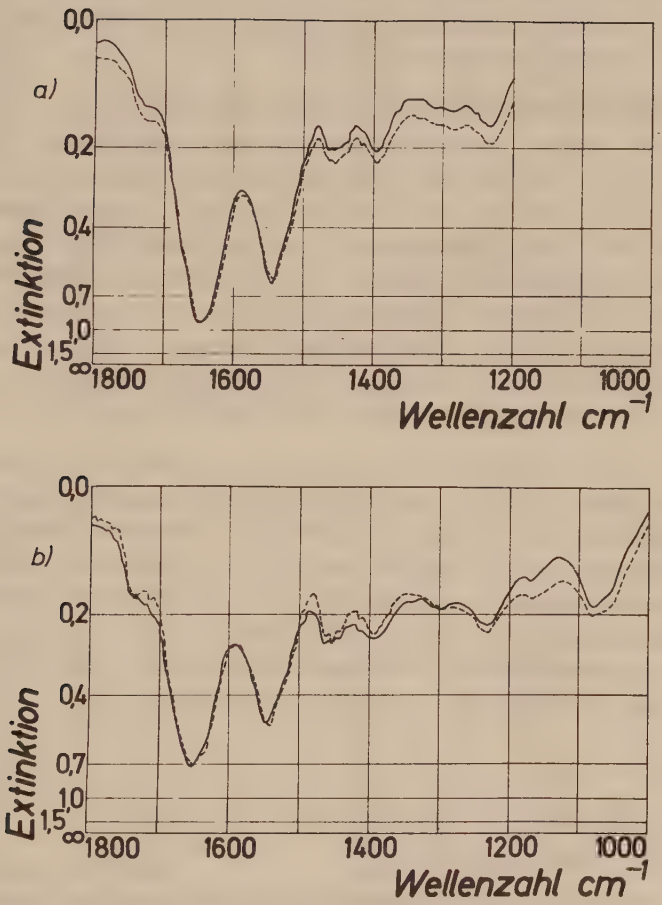


Abb. 46 a,b: FMIR- und Transmissionsspektren der Na^+- und K^+-Membranen des Gradientenbereichs > 1,2 M S
a: FMIR-Spektren
b: Transmissionsspektren
—— Na^+, --- K^+

Bestätigt wird dieser Sachverhalt durch den Verlauf der Amid-II-Bande. Sie weist mit K^+ gegenüber der Bande mit Na^+ eine Verbreiterung bei kleinen Wellenzahlen auf. Außerdem liegt das Maximum bei 1540 cm^{-1} und nicht wie mit Na^+ bei 1545 cm^{-1}. Die Schulter bei 1552 cm^{-1} im K^+-Spektrum könnte auf das NH-Übergangsmoment senkrecht zur Achse des Makromoleküls zurückzuführen sein (69).

2. Transmissions-Spektren (Abb. 44b, Tab A 8)

Das Maximum der Amid-I-Bande der K^+-Membranen liegt bei 1652 cm^{-1} und besitzt eine starke Schulter bei 1637 cm^{-1} und eine weitere schwache bei 1690 cm^{-1}. Diese Fakten sprechen für den größeren Anteil der Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation und den kleineren Anteil von Proteinen in Faltblattstruktur (parallel und antiparallel). Das Spektrum der Na^+-Membranen hingegen, welches eine Bande bei 1655 cm^{-1} aufweist, läßt auf vorwiegend α- und/oder Zufallsknäuelstruktur schließen.

Der Anteil der verschiedenen Proteinkonformationen bei den gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysierten Membranen spiegelt sich auch in der bei 1540 cm^{-1} liegenden Amid-II-Bande wieder. Sie liegt bei um 5 cm^{-1} niedrigeren Wellenzahlen als die Bande im Na^+-Spektrum. Ferner ist sie an der niederfrequenten Seite stark verbreitert.

Sonstige Unterschiede zwischen dem Na^+- und K^+-Spektrum liegen nicht vor.

(ii) In D_2O

a) FMIR-Spektren von Na^+- und K^+-Membranen

α) K^+ (Abb. 47 a,b)*

Zunächst soll vorausgesetzt werden, daß bei der Präparation der Membranen, mit denen die D_2O-Messungen durchgeführt wurden, an den Proteinen die Veränderungen stattgefunden haben, die nach Graham et al. (28) zu einer Verschiebung der Amid-I-Bande führen können. Demnach dürfte es sich bei den Banden, die ihr Maximum bei 1640 und 1642 cm^{-1}

---

* Siehe nächste Seite

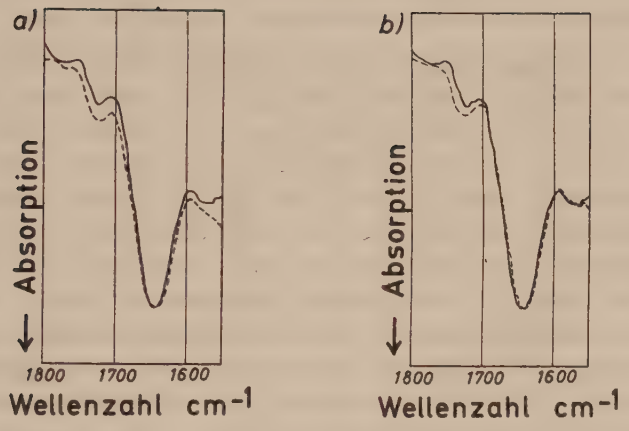


Abb. 47a,b: Spektren von K^+-Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen.
a: —— 0,9-1,0 M S, --- 1,0-1,1 M S
b: —— 0,9-1,0 M S, --- 1,1-1,2 M S

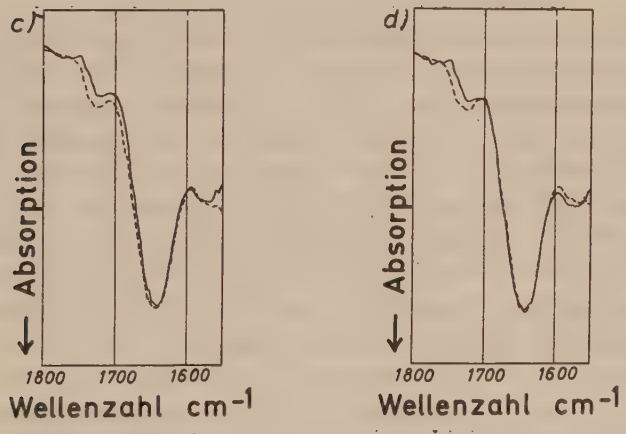


Abb. 47c,d: Spektren von Na^+-Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen.
c: —— 0,9-1,0 M S, --- 1,0-1,1 M S
d: —— 0,9-1,0 M S, --- 1,1-1,2 M S

besitzen, um diejenigen handeln, die der Amid-I-Schwingung der Proteine in Faltblattstruktur zuzuordnen sind.

Bei den Membranen der Fraktion 0,9-1,0 M S befindet sich die Amid-I-Bande bei 1642 cm^{-1} und weist eine Schulter bei 1655 cm^{-1} auf. Es kann gefolgert werden, daß neben vorwiegend ß-Struktur etwas α- und/oder Zufallsknäuel-Struktur vorliegen. Der bei 1640 cm^{-1} liegenden Bande der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S fehlt die Schulter bei 1655 cm^{-1}. Da die Bande eine Schulter bei 1687 cm^{-1} besitzt und außerdem gegenüber der Amid-I-Bande der Membranen aus dem weniger dichten Gradientenbereich bei kleinen Wellenzahlen verbreitert ist, dürften diese Membranen hauptsächlich Proteine in Faltblattstruktur (parallel und antiparallel) enthalten. Auf noch mehr Faltblattstruktur läßt die Amid-I-Bande der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,1-1,2 M S schließen.

ß) Na^+ (Abb 47 c,d)*

Die bei 1642 cm^{-1} befindlichen Amid-I-Banden der Membranen aus dem Gradientenbereich 0,9-1,0 sowie 1,0-1,1 M S lassen ebenfalls auf verschiedene Anteile der diversen Proteinkonformationen schließen. So dürften die Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S weniger Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelstruktur als die Membranen des Dichtebereichs 1,0-1,1 M S besitzen. Denn die Bande der Membranen aus dem Bereich 0,9-1,0 ist gegenüber der Bande der Membranen aus dem dichteren Gradientenbereich zwischen 1642-1655 cm^{-1} verschmälert (Vgl. Abb. 47 c). Keine Unterschiede bestehen zwischen den Amid-I-Banden der Membranen aus den Dichtebereichen 0,9-1,0 und 1,1-1,2 M S (Vgl. Abb 47 d).

---

* Um klarer hervorzuheben, wie sich die Spektren der verschiedenen Gradientenbereiche mit dem gleichen Kation unterscheiden, wurden in manchen Abbildungen Spektren wiederholt. Desgleichen wurden auch die Spektren von Membranen aus dem gleichen Dichtebereich mit verschiedenen Kationen wiederholt.

γ) Na^+ und K^+ (Abb. 47 e-g)

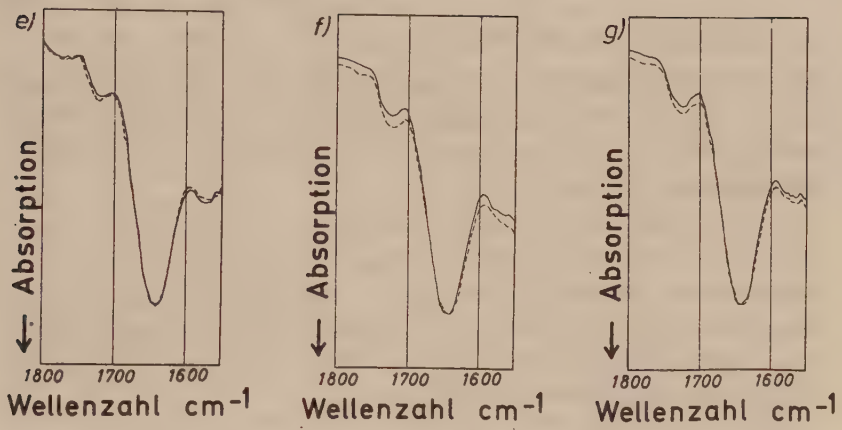


Abb. 47e-g: Spektren von K^+ und Na^+-Membranen der verschiedenen Gradientenbereiche
e: 0,9-1,0 M S
f: 1,0-1,1 M S
g: 1,1-1,2 M S
Für alle Spektren gilt: —— Na^+, --- K^+

Na^+ und K^+ haben auf die Proteine der Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S keinen unterschiedlichen Einfluß. Dagegen besitzen die Membranproteine aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S mit K^+ etwas mehr antiparallele ß-Struktur als mit Na^+. Dies läßt sich daran erkennen, daß die Bande der K^+-Membranen gegenüber derjenigen der Na^+-Membranen an der niederfrequenten Seite verbreitert, zwischen 1655 und 1642 cm^{-1} verschmälert ist und außerdem eine etwas stärkere Schulter bei 1680 cm^{-1} aufweist.

Auch bei den Membranen des Gradientenbereichs 1,1-1,2 M S läßt der Bandenverlauf in Gegenwart von K^+ und von Na^+ die Schlußfolgerung zu, daß die K^+-Membranen etwas mehr antiparallele ß-Struktur als die Na^+-Membranen enthalten. Denn die Bande der K^+-Membranen ist gegenüber derjenigen der Na^+-Membranen zwischen 1655-1642 verschmälert, zwischen 1642-1630 cm^{-1} und wiederum ab 1625 cm^{-1} zu kleinen Wellenzahlen

hin verbreitert. Außerdem besitzt das K^+-Spektrum eine etwas stärkere Schulter bei 1690 cm^{-1} als das Na^+-Spektrum.

b) Ca^{2+}-Spektren (Abb. 48, Tab. A 9)

Ca^{2+} zeigt auf die Konformation der Proteine in den Membranen aus dem Gradientenbereich 0,9-1,0 M S einen größeren Einfluß als auf die Proteine in den Membranen der anderen Gradientenbereiche.

Bei den Membranen des Dichtebereichs 0,9-1,0 M S lassen das bei 1640 cm^{-1} liegende Maximum und die Schulter bei 1680 cm^{-1} auf Faltblattstruktur - antiparallel und parallel - schließen. Die bei 1655 cm^{-1} liegende Schulter weist darauf hin, daß ein geringer Anteil der Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelstruktur vorliegen muß.

Die Amid-I-Banden der Membranen aus den beiden dichteren Gradientenbereichen sind gegenüber der Bande der Membranen aus dem Bereich 0,9-1,0 M S verschmälert. Sie weisen neben

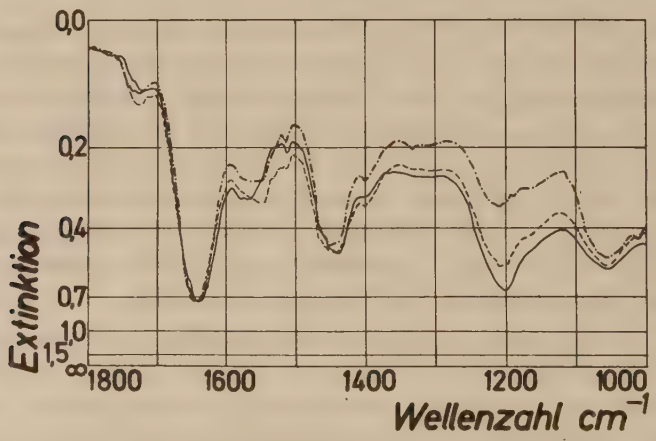


Abb. 48: Ca^{2+} Spektren von Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen

—— 0,9-1,0 M S, --- 1,0-1,1 M S, -·-·- 1,1-1,2 M S

einem Maximum bei 1645 cm^{-1} eine starke Schulter bei 1655 cm^{-1} sowie schwache Schultern bei 1630 und 1680 cm^{-1} auf.

Aus den Tabellen A 9 und A 10 geht hervor, daß die Proteine in den Membranen der beiden dichteren Gradientenbereiche hauptsächlich in einer Zwischenstruktur vorliegen. Die übrigen Proteine liegen dann hauptsächlich in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation vor. In diesen Membranen dürften in Gegenwart von Ca^{2+} die wenigsten Proteine in Faltblattstruktur vorliegen.

Aus dem Spektrenverlauf im Wellenzahlenbereich 1600-1500 cm^{-1} kann ersehen werden, daß an den Proteinen der Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S der H_2O-D_2O-Austausch am vollständigsten erfolgt ist. Diese Schlußfolgerung kann deswegen gezogen werden, weil die Amid-II-Bande der Proteine, bei denen ein H_2O-D_2O-Austausch stattgefunden hat, nur als sehr schwache Schulter an der Doppelbande mit den bei 1567 und 1580 cm^{-1} liegenden Maxima angedeutet ist.

Im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} weisen die Banden der Membranen aus den Gradientenbereichen 0,9-1,0 und 1,0-1,1 M S ziemlich ähnlich verlaufende Maxima auf. Die jeweils höchste Absorptionsintensität ist bei 1440 cm^{-1} (CH_2-Scherenschwingung (83)). Die ebenfalls im Maximum verbreiterte Bande der Membranen aus dem Gradientenbereich 1,1-1,2 M S besitzt dagegen das Maximum bei 1450 cm^{-1}.

Die Spektren der Membranen aus den Gradientenbereichen 0,9-1,0 und 1,0-1,1 M S weisen eine breitere Bande der CO_2^--symmetrischen Valenzschwingung auf als das Spektrum der Membranen des Bereichs 1,1-1,2 M S. Letztere Membranen weisen statt dessen eine Bande bei 1332 cm^{-1} auf. Sie dürfte einer der beiden Banden zuzuordnen sein, die bei den H_2O hydratisierten Proteinen durch die Kopplung der C-O-Valenz- und -OH-Deformationsschwingung in der Carboxylgruppe entstehen. (131,132).

c) Ca^{2+}-und Na^{+}-Spektren (Vgl. Abb. 49 a-c u. 50)

Da die Ca^{2+}-Spektren nach der Dialyse der Na^{+}-Membranen gegen Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer aufgenommen wurden, sind in Abb. 49 a-c jeweils die Na^{+}- und Ca^{2+}-Spektren von Membranen aus der selben Fraktion eingezeichnet. Auf diese Weise kann besser verdeutlicht werden, wie sich Ca^{2+} und Na^{+} in ihrem Einfluß auf die Proteinkonformation unterscheiden.

Aus der Abbildung 49 c geht klar hervor, daß Ca^{2+} und Na^{+} sich in ihrer Wirkung auf die Proteine in den Membranen des Gradientenbereichs 1,1-1,2 M S nicht unterscheiden. Bei den Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S scheint Ca^{2+} eine geringfügige Verminderung der α- und/oder Zufallsknäuelkonformation bewirkt zu haben (Abb. 49 b). Der Abb. 49 a kann entnommen werden, daß

Ca^{2+} bei den Proteinen der Membranen aus dem Gradientenbereich 0,9-1,0 M S in großem Maße die Umfaltung in Faltblattstruktur induziert.

Nach der Aufnahme des Ca^{2+}-Spektrums wurden die Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S gegen Na^{+}-Kakodylat-Puffer rückdialysiert. Aus den Spektren der Abb. 50 geht hervor, daß die durch Ca^{2+} induzierte Konformationsumwandlung reversibel ist.

d) Mit physiologischen Lösungen (Abb. 51 a-c, Tab. A 9, A 10)

1. Gradientenbereich 1,0-1,1 M S

Die Amid-I-Bande der Membranen, die gegen physiologische Lösung dialysiert wurden, weist ein sich zwischen 1640-1647 cm^{-1} erstreckendes Maximum und eine Schulter bei 1655 cm^{-1} auf. Der Bandenverlauf läßt darauf schließen, daß Faltblattstruktur und Zwischenstrukturen zu gleichen Anteilen vorliegen. α- und/oder Zufallsknäuelstruktur dürfte nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden sein. Die Membranen, die mit Na^{+}-physiologischer Lösung behandelt wurden, schei-

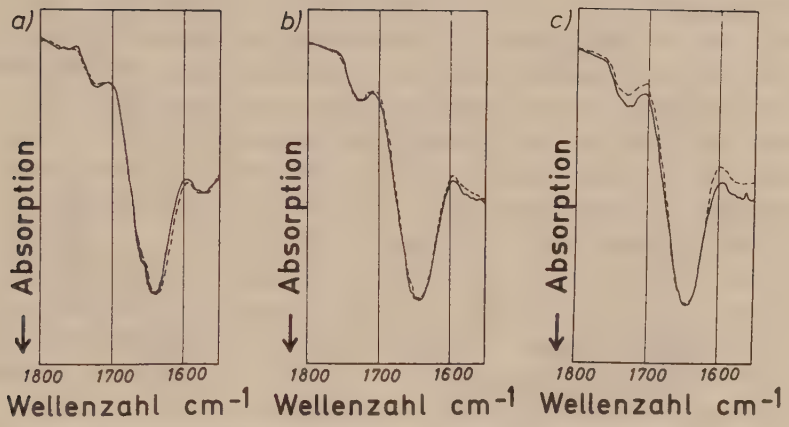


Abb. 49a-c: Spektren der Ca^{2+}- und Na^{+}-Membranen der verschiedenen Gradientenbereiche
a: 0,9-1,0 M S
b: 1,0-1,1 M S
c: 1,1-1,2 M S
—— Na^{+}, --- Ca^{2+}

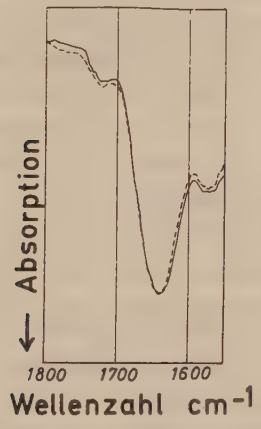


Abb. 50: Spektren der Ca^{2+}- und Na^{+}-Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S. Die Aufnahme des Na^{+}-Spektrums erfolgte nach der Dialyse der Ca^{2+}-Membranen gegen Na^{+}-Kakodylat-Puffer
—— Ca^{2+}, --- Na^{+}

nen etwas weniger Proteine in α- und/oder Zufallsknäuelstruktur zu enthalten, statt dessen aber einige Proteine, die sich zur antiparallelen Faltblattstruktur umgefaltet haben. Diese Schlußfolgerung kann aus der Abschwächung der Schulter bei 1655 cm^{-1}, der Verbreiterung der Bande zwischen 1630-1635 cm^{-1} und der Ausbildung einer schwachen Schulter bei 1680 cm^{-1} gezogen werden. Das bei 1645 cm^{-1} liegende Maximum legt die Vermutung nahe, daß die meisten Proteine in einer Übergangstruktur vorliegen.

Die Proteine in den Membranen, die gegen K^+-physiologische Lösung dialysiert wurden, dürften aufgrund des bei 1640 cm^{-1} befindlichen Maximums hauptsächlich in Faltblattstruktur vorliegen. Nach der Schulter bei 1680 cm^{-1} zu urteilen, muß ein Teil der Proteine antiparallel angeordnet sein.

Die drei physiologischen Lösungen zeigen kaum einen unterschiedlichen Einfluß auf die Intensität der Amid-II-Bande. D.h. in allen Fällen müßte der H_2O-D_2O-Austausch in gleichem Ausmaß stattgefunden haben. Die Amid-II'-Bande sollte demzufolge in allen Spektren die gleich hohe Intensität aufweisen. Nun zeigen aber im Wellenzahlenbereich 1500-1400 cm^{-1} - in dem sich die Amid-II-Bande in Nachbarschaft der Banden der HDO-Scherenschwingung, der CH_2-Deformationsschwingung und der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung befindet - nur die Banden der Membranen in Na^+- und K^+-physiologischer Lösung den gleichen Verlauf. Die Bande der Membranen, die gegen physiologische Lösung dialysiert wurden, besitzt eine weitaus geringere Intensität.

Wie aus vorangegangenen Spektren zu entnehmen ist, zeigen die Banden der CH_2-Deformationsschwingung und der CH_3-asymmetrischen Deformationsschwingung keinen so großen von Kationen abhängigen Intensitätsunterschied, wie er in Abb. 51 a zu ersehen ist. Demnach dürfte der Intensitätsunterschied auf die Bande der HDO-Scherenschwingung zurückzuführen sein.

2. Gradientenbereich 1,1-1,2 M S (Abb. 51 c, Tab. A 9, A 10)

. Die Amid-I-Bande der Membranen, die gegen Na^+-physiologische Lösung dialysiert wurden, besitzt ein Maximum

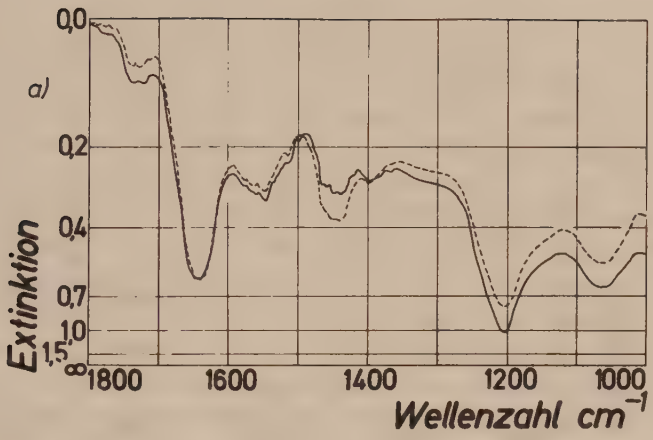


Abb. 51a: Spektren der Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S, die gegen physiologische und Na^+-physiologische Lösung dialysiert wurden.
—— physiologische Lösung, --- Na^+-physiologische Lösung

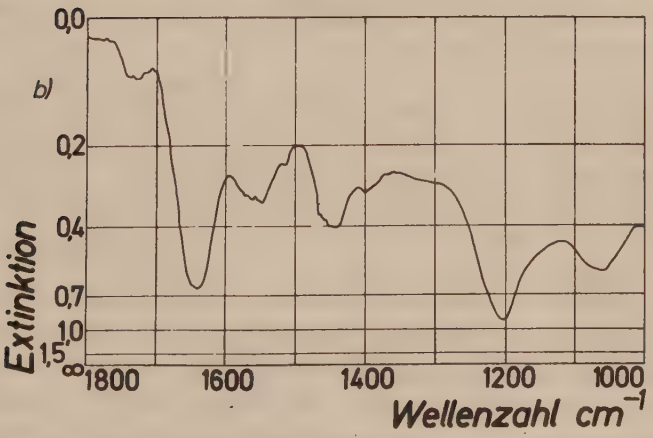


Abb. 51b: Spektrum der Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S, die gegen K^+-physiologische Lösung dialysiert wurden.

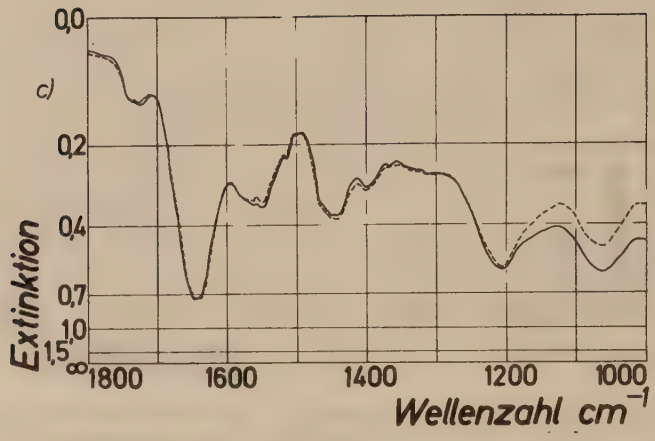


Abb. 51 c: Spektren der Membranen des Gradientenbereichs 1,1-1,2 M S. Die Membranen wurden gegen Na^+- und K^+-physiologische Lösung dialysiert.
—— Na^+-physiologische Lösung, --- K^+-physiologische Lösung
Die Dialysen erfolgen in der Reihenfolge: 1. K^+-physiologischer , 2. Na^+-physiologischer Puffer.

bei 1647 cm^{-1}, eine starke Schulter bei 1640 cm^{-1} sowie schwache Schultern bei 1655 und 1680 cm^{-1}. Diesem Bandenverlauf nach zu urteilen, liegt die Mehrzahl der Proteine in einer Übergangskonformation vor. Ein geringer Teil der Proteine ist ß-strukturiert (antiparallel und/oder parallel), noch weniger Proteine liegen in α- und/oder Zufallsknäuelkonformation vor. Bei den Membranen, die gegen K^+-physiologische Lösung dialysiert wurden, liegen etwas mehr Proteine in Faltblattstruktur vor(Maximum bei 1642 cm^{-1}) . Ansonsten sind keine wesentlichen Unterschiede 1. an der Amid-I-Bande, 2. im übrigen Wellenzahlenbereich festzustellen.

6.4.1.3 Diskussion der Resultate

a) Zur Konformation der Proteine (Messungen in der FMIR-Küvette)

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind Funktion und Struktur der Membranen eng miteinander verknüpft. Die Struktur hängt von den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden ab; und diese Wechselwirkungen können durch verschiedene Variablen wie Ionen, pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur usw. gestört werden. Eine Änderung der Wechselwirkungen kann zu Konformationsumwandlungen sowohl der Proteine als auch Lipide führen (109).

Im folgenden soll im wesentlichen auf die Konformation der Proteine eingegangen werden. Wie aus den Resultaten hervorgeht, unterscheiden sich die verwendeten Ionenmilieus in ihrem Einfluß auf die Konformation der Proteine in den Membranen der vier untersuchten Subfraktionen erheblich. Die Unterschiede dürften wohl mit der Funktion der jeweiligen Membranen korreliert sein.

Es soll noch einmal in Erinnerung gebracht werden, welche Membranen in den Subfraktionen enthalten sind. Lt. Dekirmenjan et al. (60) und Lemkey-Johnston et al. (61) sind im Gradientenbereich 0,9-1,0 M S sehr viele axonale Segmente und kaum Synapsenfragmente enthalten. Mit steigender Dichte des Saccharosegradienten nimmt die Anzahl von Synaptosomen mit eingeschlossenen Mitochondrien erheblich zu. In den Fraktionen sind allerdings noch etliche axonale Segmente anzutreffen. Deren Konzentration sinkt mit zunehmender Dichte des Gradienten ab.

Im Gradientenbereich 1,1-1,2 M S liegen bereits freie Mitochondrien vor. Im Präzipitat befindet sich neben vielen Synaptosomen und wenigen Axonmembranen ein großer Prozentsatz an freien Mitochondrien (Vgl. S. 32).

Wie der Tabelle A 10 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Proteinkonformationen der hydratisierten Membranen bereits in Tris-EDTA-Puffer. Die Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S enthalten mehr ß-Struktur als die Mem-

branen der anderen Gradientenbereiche. Aus den Amid-I-Banden der nach der Dialyse gegen K^+-Kakoylat-Puffer aufgenommenen Spektren geht hervor, daß bei den Proteinen aller Fraktionen Konformationsumwandlungen stattgefunden haben. Das Ausmaß der Umwandlung (Umfaltung) nimmt mit dichter werdendem Gradientenbereich zu; dennoch enthalten die

Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S mit K^+ im Vergleich zu den Membranen der anderen Gradientenbereiche die meisten Proteine in antiparalleler ß-Struktur.

Im übrigen lassen die Veränderungen der Proteine in den Membranen aus den verschiedenen Gradientenbereichen darauf schließen, daß der dichteste Gradientenbereich die Mehrzahl von Membranen enthält, deren Proteine sich in Gegenwart von K^+ zur ß-Konformation umfalten.

Nach dem Austausch der K^+- gegen die Na^+-Ionen läßt der Verlauf der Spektren von den Membranen aus den verschiedenen Gradientenbereichen folgende Schlußfolgerungen zu:

Gradientenbereich 0,9-1,0 M S: K^+ und Na^+ unterscheiden sich nicht in ihrem Einfluß auf die Proteine.

Gradientenbereich 1,0-1,1 M S: Na^+ hat einen anderen Einfluß auf Membranproteine als K^+ und bewirkt eine Reduzierung der antiparallelen ß-Struktur. Es entstehen mehr Zwischenstrukturen.

Gradientenbereich > 1,1 M S: Na^+ besitzt einen von K^+ verschiedenen Einfluß auf die Konformation der Membranproteine und bewirkt im Gegensatz zu K^+ eine Verminderung der antiparallelen ß-Struktur, wobei mehr α- und/oder Zufallsknäuelkonformation entsteht.

K^+-Ionen scheinen im allgemeinen bei den Proteinen der Membranen aus dem Gradientenbereich > 1,0 M S die Bildung von ß-Konformation (antiparallel und parallel) zu fördern.

Zu dieser Hypothese veranlassen die Resultate, die mit hydratisierten und deuterierten Membranen erhalten wurden.

Bei einigen in D_2O durchgeführten Versuchen wurden anstatt der Kakodylat-Puffer physiologische Lösungen verwendet. Den Spektren der Abbildungen 51 a und b zufolge liegen die Proteine nach der Dialyse gegen K^+-physiologische Lösung vorwiegend in Faltblattstruktur vor (antiparallel und parallel). Nach der Dialyse gegen die anderen physiologischen Lösungen liegen die Proteine zwar hauptsächlich in einer Zwischenstruktur vor, ß-Struktur überwiegt jedoch vor der α- und/oder Zufallsknäuelkonformation.

Das Ergebnis mit der physiologischen Lösung ließe sich damit erklären, daß die Lösung ebenfalls vorwiegend K^+-Ionen enthält. Bei der Auslegung des mit Na^+-physiologischer Lösung erhaltenen Ergebnisses versagt diese Interpretation.

An dieser Stelle muß wieder auf den D_2O-Effekt hingewiesen werden, der bereits bei den Resultaten mit Myelin und Erythrozytenmembranen erwähnt wurde:

In D_2O besteht die Tendenz, daß Proteine ß-Struktur annehmen.

Nun zum Einfluß von Ca^{2+}-Ionen auf die Konformation der Membranproteine. Es ist bekannt, daß Ca^{2+} sehr stark von Phosphatidylserin und Phosphatidylcholamin gebunden wird (109). Weitere Untersuchungen, die mittels Ramanspektroskopie durchgeführt wurden, haben ergeben, daß von den zweiwertigen Kationen Ca^{2+} u. Cd^{2+} die Konformation der Kohlenwasserstoffketten in Phopholipidschichten am stärksten beeinflussen. Anionen und einwertige Kationen bewirken keine Veränderung der Kettenkonformation (124). Tasaki (30) stellte fest, daß eine geringe Veränderung des Verhältnisses von ein- zu zweiwertigen Kationen sowohl an synthetischen als auch natürlichen Makromolekülen starke Veränderungen zur Folge hat.

Anhand dieser Aussagen wäre fast zu erwarten, daß Ca^{2+} auf die Membranen der verschiedenen Fraktionen, wenn nicht den gleichen, so zumindest einen ähnlichen Effekt ausübt.

Eine völlig gleiche Beeinflussung der Membranen ist jedoch auszuschließen, weil die Protein- und Lipidzusammensetzung sowie auch das Verhältnis der Protein- zur Lipidkonzentration von Membrantyp zu Membrantyp variieren.

Wie den Ca^{2+}-Spektren zu entnehmen ist (Vgl. Abb. 48), enthalten die Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S den größten Anteil von Proteinen in ß-Struktur. Die starke Beeinflussung der Proteine dieses Gradientenbereichs durch Ca^{2+} wird auch an der Amid-II-Bande ersichtlich. Die Deuterierung muß in dem Ausmaße stattgefunden haben, daß sie fast völlig durch die Amid-II'-Bande ersetzt wird.

Überdies kann aus den Abbildungen 49 a-c, in denen die Spektren der Na^{+}- und Ca^{2+}-Membranen dargestellt sind, entnommen werden, daß das

Überwiegen von ß-Konformation tatsächlich ein Ca^{2+}-Effekt ist.

Aus der Abbildung 50 kann ferner ersehen werden, daß die Konformationsumwandlung reversibel ist.

Die obigen Befunde stehen gut mit Nachmansohns Theorie (7,36,129) in Einklang. Diese Theorie besagt, daß bei der Weiterleitung des elektrischen Impulses in der Axonmembran Konformationsumwandlungen stattfinden, bei denen u.a. Ca^{2+} von Bedeutung ist; und wie bereits zu Anfang der Diskussion erwähnt, befinden sich im Gradientenbereich 0,9-1,0 M S viele axonale Segmente.

b) Vergleich der FMIR- und Transmissions-Spektren (Vgl. Abb. 44-46, Tab A8 und A 10)

Bereits in der Diskussion zu den Ergebnissen, die mit Erythozytenmembranen erhalten wurden, werden die tiefgreifenden Unterschiede zwischen den beiden Meßverfahren erwähnt (Vgl. S. 127). Sie bestehen vor allem in der Probenvorbereitung für die Messung und in der Dialysedauer.

Diese Unterschiede dürften die Ursache dafür sein, daß die Transmissions- und FMIR-Spektren im wesentlichen an den Amid-I-Banden, den Banden der CH_3-asymmetrischen und CH_2-Deformationsschwingung sowie an der Bande im Wellenzahlenbereich 1100-1000 cm^{-1} * einen unterschiedlichen Verlauf zeigen. Insbesondere der vorübergehende partielle Wasserentzug bei der Filmherstellung dürfte einen sehr großen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen haben. Dadurch könnte eine irreversible Umordnung der Makromoleküle bewirkt werden. Die höhere Intensität der oben erwähnten Deformationsschwingungen und das im Vergleich zu den FMIR-Spektren bei höheren Wellenzahlen liegende Maximum der Bande des Wellenzahlenbereichs 1100-1000 cm^{-1} - die überdies noch verbreitert ist -,lassen auf eine Konformationsumwandlung der Lipide schließen.

Desgleichen läßt auch der Verlauf der Amid-Banden in den FMIR- und Transmissions-Spektren schlußfolgern, daß Unterschiede zwischen der Proteinkonformation in den Membranfilmen und der in den Membransuspensionen in der FMIR-Küvette bestehen.

In den Transmissions-Spektren befindet sich das Maximum der Amid-I-Bande stets bei höheren Wellenzahlen als in den FMIR-Spektren. Die Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S zeigen die größten, die Membranen des Gradientengereichs 1,1-1,2 M S die kleinsten Differenzen in der Lage der Maxima. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß an den Proteinen der Membranen aus dem Gradientenbereich 0,9-1,0 M S durch die für die Transmissionsmessungen benötigten Präparationsschritte die größten Veränderungen stattgefunden haben.

Da in der Fraktion 0,9-1,0 M S die meisten axonalen Segmente enthalten sind, kann auch gefolgert werden:

Axonmembranen enthalten Proteine, die bei drastischen Präparationsschritten starke Veränderungen erfahren.

---

* Dieser Unterschied zeigt sich beim Vergleichen der Spektren der Abbildungen (44-46)b mit den FMIR-Spektren, die bei anderen Versuchsserien aufgenommen wurden.

6.4.2 Auswirkung der Dialysenreihenfolge auf den Spektrenverlauf

6.4.2.1 Durchgeführte Meßreihen

Membranen der Gradientenbereiche 0,9-1,0 und 1,0-1,1 M S wurden nicht wie üblich bei der dritten Dialyse gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysiert. Sondern, nachdem gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert worden war, erfolgte zunächst die Dialyse gegen Na^+- und dann gegen K^+-Kakodylat-Puffer. Mittels dieser Versuchsserie sollte eine Antwort darauf gefunden werden, ob sich die Dialysenreihenfolge auf die Konformation der Proteine auswirkt.

6.4.2.2 Resultate

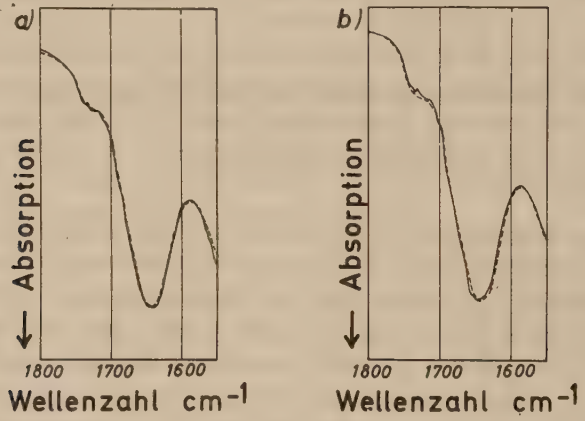


Abb. 52 a u. b: FMIR-Spektren von Na^+- und K^+-Membranen, bei denen nacheinander gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA-, 3. Na^+-Kakodylat-, 4. K^+-Kakodylat-Puffer dialysiert wurde.
a: Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S
b: Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S
Für beide Abbildungen gilt: —— Na^+, --- K^+

a) Gradientenbereich 0,9-1,0 M S (Abb. 52 a)

Bei den Membranen dieses Gradientenbereichs besitzt die Amid-I-Bande unabhängig von der Reihenfolge der Dialysen

den gleichen Verlauf.

b) Gradientenbereich 1,0-1,1 M S

Die Amid-I-Bande der Na^+-Membranen weist ein Maximum bei 1645 cm^{-1} und Schultern bei 1655, 1630 und 1690 cm^{-1} auf. Nach dem Austausch von Na^+ gegen K^+ verschiebt sich das Maximum nach 1640 cm^{-1} und die Schulter bei 1655 cm^{-1} verschwindet.

Dieses bedeutet, wie der Vergleich mit den Spektren in Abb. 44,45 a zeigt - für diese Meßserie fand die umgekehrte Dialysenreihenfolge statt -, daß, egal in welcher Reihenfolge die Dialysen stattfinden, die Amid-I-Bande der K^+-Membranen stets bei niedrigeren Wellenzahlen als die der Na^+-Membranen liegt. Ein Unterschied besteht darin, daß die Amid-I-Bande sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ um einige Wellenzahlen höher liegt, wenn zuerst die Dialyse gegen Na^+-Kakodylat-Puffer erfolgt.

6.4.3.3 Diskussion der Resultate

a) Gradientenbereich 0,9-1,0 M S

In den Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S sind keine Proteine enthalten, auf deren Konformation Na^+ und K^+ einen unterschiedlichen Einfluß ausüben.

b) Gradientenbereich 1,0-1,1 M S

Aus den obigen Ergebnissen kann die Schlußfolgerung gezogen werden: Sowohl K^+ als auch Na^+ induzieren bei einem kleinen Teil der Proteine irreversible Konformationsumwandlungen. Wäre dieses nicht der Fall, so würde die Amid-I-Bande unabhängig von der Dialysenreihenfolge mit einem bestimmten Kation den gleichen Verlauf aufweisen.

6.4.3 Auswirkung des Einfrierens und Wiederauftauens auf den Spektrenverlauf

6.4.3.1 Durchgeführte Meßreihen

Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S wurden nacheinander gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA, 3. K^+-Kakodylat-Puffer dialysiert. Membranen des Gradientenbereichs > 1,2 M S wurden nur gegen 1. H_2O, 2. Tris-EDTA-Puffer dialysiert. Es wurden Spektren aufgenommen von frischen Membranen und solchen, die eingefroren und wieder aufgetaut wurden.

6.4.3.2 Resultate (Abb. 53 a und b)

a) Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S

Die Amid-I-Bande der frischen Membranen besitzt ein Maximum zwischen 1638-1645 cm^{-1} sowie Schultern bei 1655 und 1680 cm^{-1}.

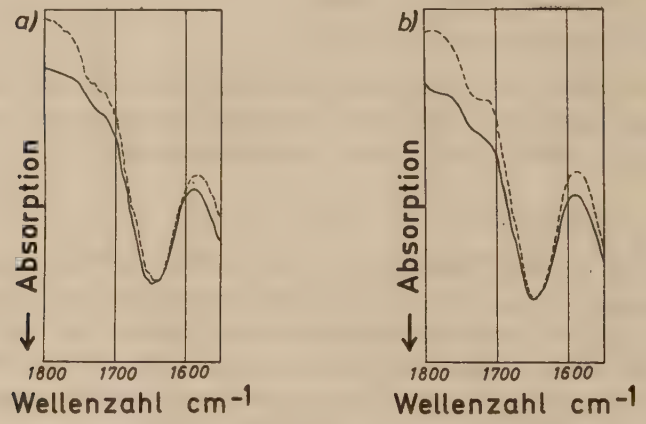


Abb. 53 a u. b: Spektren der K^+-Membranen der Gradientenbereiche 1,0-1,1 M S und > 1,2 M S in frischem und wieder aufgetautem Zustand.
a: Gradientenbereich 1,0-1,1 M S
b: Gradientenbereich > 1,2 M S
Für beide Abbildungen gilt:
--- frisch, —— aufgetaut

Die Amid-I-Bande der aufgetauten Membranen verschiebt sich nach 1650 cm^{-1}. Gleichzeitig verbreitert sich die Bande an der höherfrequenten Seite.

b) Membranen aus dem Gradientenbereich > 1,2 M S

Die Amid-I-Bande der frischen Membranen des Gradientenbereichs > 1,2 M S, die sich in Tris-EDTA befanden, liegt um drei Wellenzahlen niedriger als die Bande der aufgetauten Membranen. Auch in diesem Falle ist die Verschiebung mit einer Bandenverbreiterung an der höherfrequenten Seite verbunden. Die Verbreiterung ist jedoch nicht so stark wie bei den Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S.

6.4.3.2 Diskussion der Resultate

Die Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S scheinen Proteine zu besitzen, deren Konformation durch Einfrieren und wieder Auftauen mehr beeinflußt wird als die Konformation der Proteine des dichteren Gradientenbereichs. In beiden Fällen bewirkt die als unphysiologisch zu wertende Methode des Einfrierens eine Zunahme von α- und/oder Zufallsknäuelstruktur.

6.4.4 Temperaturabhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen

6.4.4.1 Durchgeführte Meßreihen

Mittels zweier Dichtegradientenzentrifugationen wurden Membranen aus Rattenhirn subfraktioniert. Mit Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S wurde die Temperaturabhängigkeit in Gegenwart verschiedener Kationen sowohl in H_2O als auch D_2O untersucht. Bei keinem der Versuche wurde vorher gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert. Es wurde zunächst entweder gegen H_2O oder D_2O dialysiert, um die Saccharose zu entfernen.

Die Membranen wurden nacheinander gegen 1. K^+-, 2. Na^+- und Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert. Die Einstellung der Temperaturen erfolgte mittels Thermostaten im IR-Gerät. Die Mes-

sungen wurden 30 Minuten nach dem Erreichen der gewünschten Temperatur begonnen. Es wurde zuerst stets bei 10° C, dann bei 20° C und zuletzt bei 30° C (D_2O) oder 35° C (H_2O) gemessen. Außerdem erfolgten mit Na^+ und Ca^{2+} sowohl in H_2O als auch D_2O Messungen bei 50° C.

6.4.4.2 Resultate

a) In H_2O

Im Spektrum der K^+-Membranen bildet sich beim Übergang von 10° auf 20° C eine Schulter bei 1635 cm^{-1} aus. Dabei verschiebt sich das Maximum von 1647 cm^{-1} auf 1650 cm^{-1}. Auch bei 35° C ist das Maximum bei 1647 cm^{-1}. Bei gleichzeitiger Verbreiterung der Bande an der niederfrequenten Seite bildet sich eine starke Schulter bei 1680 cm^{-1} aus.

Bei den Na^+-Membranen verschiebt sich bereits bei 20° C das Maximum von 1650 nach 1645 cm^{-1}. Bei 35° C befindet es sich dann bei 1642 cm^{-1}. Während die K^+-Membranen bei dieser Temperatur eine Schulter bei 1635 cm^{-1} besitzen, liegt die Schulter im Spektrum der Na^+-Membranen bei 1655 cm^{-1}. Auch mit Na^+ ist die Bande bei 35° C an der niederfrequenten Seite viel breiter als die Bande bei 10° C. Eine extrem starke Verschiebung der Bande der Na^+-Membranen nach kleinen Wellenzahlen findet bei 50° C statt. Das Maximum befindet sich dann bei 1637 cm^{-1}. Die Verschiebung des Maximums ist mit einer Verbreiterung von 10 Wellenzahlen an der niederfrequenten Seite verbunden.

Wie Abb. 54 f, in der die Spektren von den K^+- und Na^+-Membranen bei 10° C abgebildet sind, zeigt, unterscheiden sich die Amid-I-Banden unwesentlich im Maximum. Lediglich die Bande der Na^+-Membranen ist gegenüber derjenigen der K^+-Membranen zu beiden Seiten hin etwa gleich stark verbreitert. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf den Hydratationsgrad zurückzuführen. Der Vergleich der Spektren von Abb. 54 g, in der die Spektren der Na^+- und K^+-Membranen bei 35° C abgebildet sind, zeigt, daß sich diese Verbreiterung

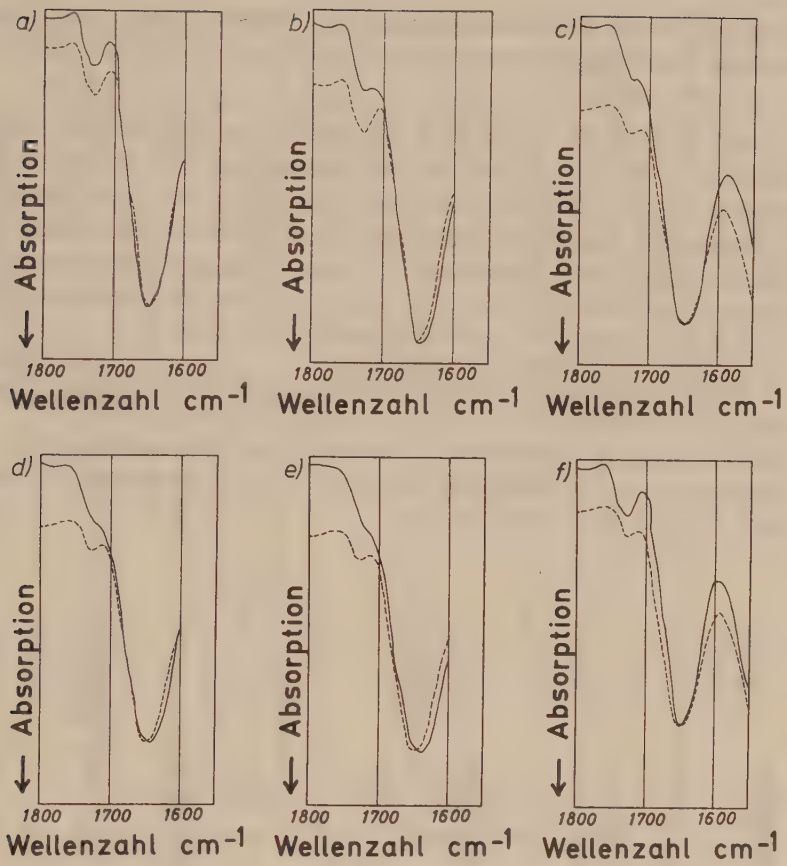


Abb. 54a-e: Temperaturabhängigkeit von Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S
---- 10° C, —— 20°, 35° und 50° C

a: K^+-Membranen bei 10° und 20° C
b: K^+-Membranen bei 10° und 35° C
c: Na^+-Membranen bei 10° und 20° C
d: Na^+-Membranen bei 10° und 35° C
e: Na^+-Membranen bei 10° und 50° C

Abb. 54f: Na^+- und K^+-Membranen bei 10° C
----Na^+, —— K^+

auch bei hohen Wellenzahlen nicht verändert. Lediglich der Verlauf der Maxima unterscheidet sich, wie bereits vorher erläutert wurde.

Der Abb. 54 h, in welcher die Amid-I-Banden der Na^+-Membranen bei 50° C und die der Ca^{2+}-Membranen bei 10° C dargestellt sind, ist zu entnehmen: Unabhängig von der Ionenbeladung der Membranen verschiebt sich beim Wiedereinstellen der niedrigen Temperatur die Amid-I-Bande zurück nach hohen Wellenzahlen . Bei 50° C besitzen die Ca^{2+}-Membranen eine bei 1640 cm^{-1} liegende symmetrische Bande.

Was die Bande der C=O-Valenzschwingung anbetrifft, so verbreitert sich diese bei 50° C mit Ca^{2+} weit mehr als mit den anderen Kationen. In allen Fällen ist das Maximum nicht deutlich ausgeprägt, sondern die C=O-Bande geht fliessend in die Amid-I-Bande über.

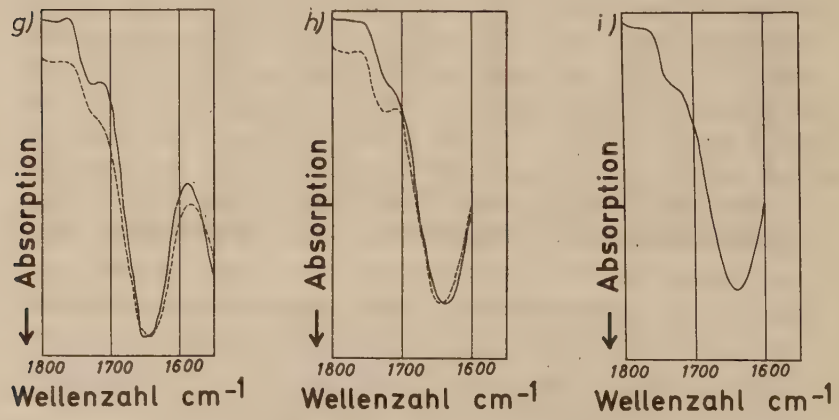


Abb. 54 g: K^+- und Na^+-Membranen bei 35° C
—— K^+, --- Na^+

h: Na^+-Membranen bei 50° C, Ca^{2+}-Membranen bei 10° C . —— Na^+, --- Ca^{2+}

i: Ca^{2+} bei 50° C.

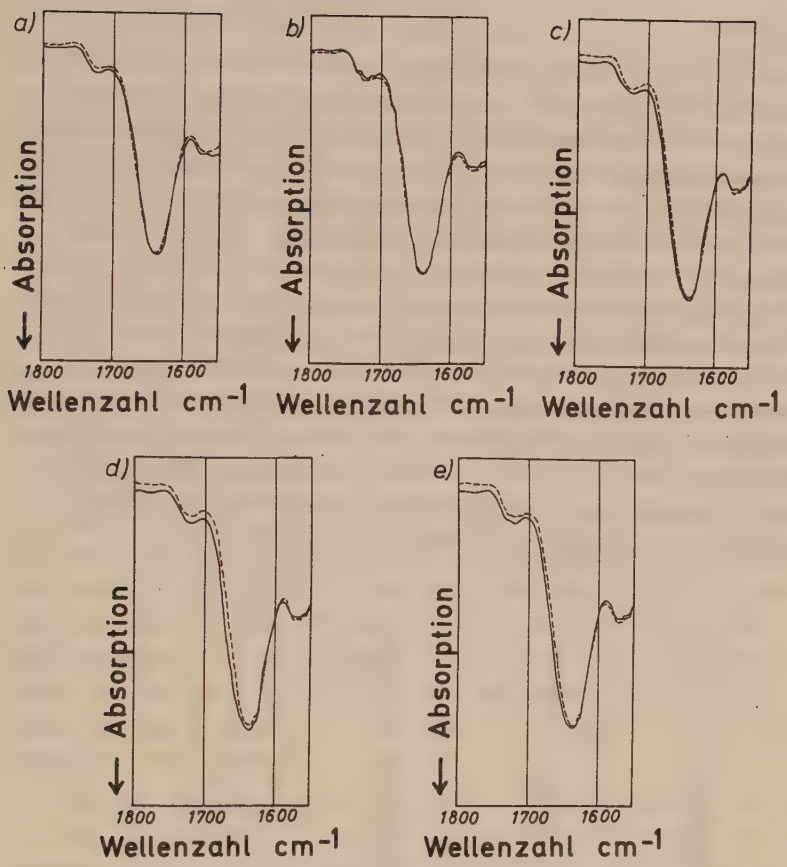


Abb. 55a-d: Temperaturabhängigkeit von deuterierten Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S
—— 10° C, --- (30° und 50° C)
a: Na^{+}-Membranen bei 10° und 30° C
b: K^{+}-Membranen bei 10° und 30° C
c: Ca^{2+}-Membranen bei 10° und 30° C
d: Ca^{2+}-Membranen bei 10° und 50° C

Abb. 55e: Ca^{2+}-Membranen bei 10° C, bevor sie auf 50° C erwärmt wurden und bei 10° C nach dem Abkühlen
—— vorher, --- nachher

b) In D_2O

Für die K^+- und Na^+-Membranen verändert sich beim Übergang von 10° C auf 30° C im Bereich der Amid-I-Bande nichts. Lediglich die Intensität der Bande der CO_2^--asymmetrischen Valenzschwingung nimmt zu. Für die Ca^{2+}-Membranen verschmälert sich die Amid-I-Bande an der höherfrequenten Seite bereits bei 30° C. Die Verschmälerung wird bei 50° C etwas stärker. Dieser Bandenverlauf bleibt nach dem Abkühlen auf erneut 10° C bestehen (Vgl. Abb. 55 e). Aus den Abbildungen 55 f und g geht hervor, daß die Amid-I-Bande der Ca^{2+}-Membranen gegenüber den Banden der K^+- und Na^+-Membranen zu kleinen Wellenzahlen verschoben ist. Außerdem besitzt das bei 1640 cm^{-1} liegende Maximum bei allen Temperaturen eine Unsymmetrie bei 1630 cm^{-1}. Dabei fehlt eine Schulter zwischen 1680-1690 cm^{-1}, die auf den antiparallelen Anteil der Faltblattstruktur schließen lassen könnte.

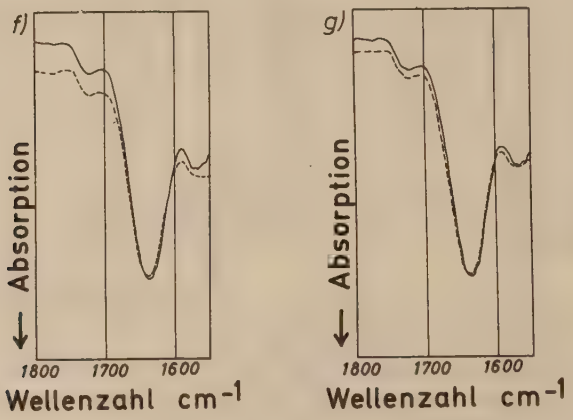


Abb. 55 f: Spektren von Ca^{2+}- und Na^+-Membranen bei 10° C
—— Ca^{2+}, --- Na^+

Abb. 55 g: Spektren von Ca^{2+}- und K^+-Membranen bei 10° C
—— Ca^{2+}, --- K^+

6.4.4.3 Diskussion der Resultate

a) In H_2O

Bei der Temperaturerhöhung ändert sich die Konformation der Proteine in den Membranen in Abhängigkeit von den darin befindlichen Kationen, was durch die Verschiebung des Maximums zu kleinen Wellenzahlen und die Bandenverbreiterung an der niederfrequenten Seite erkennbar wird. Diese Verschiebung ist mit Na^+ größer als mit K^+. Während mit Na^+ die Asymmetrie des Maximums bei hohen Wellenzahlen liegt, ist mit K^+ das Umgekehrte der Fall. Mit beiden Kationen liegen Schultern bei 1680 cm^{-1} vor. Sie werden mit steigender Temperatur intensiver. Mit Ca^{2+} findet ebenfalls eine Bandenverschiebung zu kleinen Wellenzahlen hin statt. Eine Schulterbildung bleibt jedoch aus.

Es ist darauf zu schließen, daß mit Na^+ und K^+ bei steigender Temperatur mehr ß-Konformation entsteht und zwar mit antiparallelem Anteil. Diese Konformationsumwandlung muß mit Na^+ stärker als mit K^+ sein. Daher auch die ungleichen Unsymmetrien der Maxima. Bei Ca^{2+} dagegen läßt die Verschiebung des Maximums zu kleinen Wellenzahlen, ohne daß sich eine Schulter ausbildet, nur auf die Bildung einer Zwischenstruktur schließen.

Bei den Membranen, die auf 35° C erhitzt wurden, deuten die Bandenlage und die Schultern der Na^+-Membranen auf überwiegend antiparallele ß-Struktur hin. Bei den K^+-Membranen müßte überwiegend α- und/oder Zufallsknäuelkonformation vorliegen.

Zu der Bandenverschiebung zu kleinen Wellenzahlen ist zu bemerken, daß sie insbesondere für Na^+ nicht auf die H_2O-Scherenschwingung zurückzuführen ist. Denn nach Fox et al. (130) liegt deren Bande für 70° C bei 1642 cm^{-1} und nach Walrafen (119) für 25° C bei 1645 cm^{-1}. Was K^+ anbetrifft, so sprechen die Schultern gegen die Bande der H_2O-Scherenschwingung. Da auch die Ca^{2+}-Bande niedriger liegt als die oben angegebenen Werte, kann die Verschiebung einer Kon-

formationsumwandlung zugeschrieben werden.

b) In D_2O

Bei den Versuchen zur Temperaturerhöhung in D_2O fällt auf, daß bei den Na^+- und K^+-Membranen keine Veränderungen an der Amid-I-Bande auftreten. Durch das Übereinanderlegen der mit den gleichen Kationen aufgenommenen Spektren der Abbildungen 54 und 55 wird dieser Sachverhalt verständlich. Man erkennt, daß die Amid-I-Banden der deuterierten Membranen stark zu kleinen Wellenzahlen verschoben sind. Es ist darauf zu schließen, daß ein großer Teil der Membranproteine aufgrund der Deuterierung in Faltblattstruktur übergegangen ist. Bei den K^+- und Na^+-Membranen muß dies in einem solchen Ausmaße geschehen sein, daß selbst bei Temperaturerhöhung keine zusätzliche Bildung von ß-Struktur nachzuweisen ist. In Gegenwart von Ca^{2+} muß D_2O einen anderen Effekt auf die Konformationsumwandlung der Proteine gehabt haben, so daß bei Temperaturerhöhung noch Strukturumwandlungen stattfinden können.

6.5 Resultate der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen

Nach Papakostidis (44) sollen Proteine der Axonmembranen in Gegenwart von Kaliumionen vorwiegend in ß-Struktur vorliegen. Im Kapitel 2.6.5.1 ("Problematik bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit") wird bereits erwähnt, daß die Membranfraktion eines Saccharosegradienten (0,9-1,0 M S), die vorwiegend Axonmembranen enhalten soll (60,61), keine derart durch K^+ beeinflußbaren Proteine enthält. Diese Proteine befinden sich laut den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in der Membranfraktion > 1,0 M S.

Die Versuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben, daß es Calciumionen sind, in deren Gegenwart die Proteine der sogenannten "Axonmembranfraktion"* in ß-Struktur vorliegen. Keine andere Membranfraktion aus Rattenhirn zeigte eine durch Calciumionen induzierte Konformationsumwandlung zur ß-Struktur. Es wäre also darauf zu schließen, daß Calciumionen bei der Fortpflanzung des elektrischen Impulses in der Nervenfaser eine wichtige Rolle spielen. Dieses Ergebnis würde Nachmansohns Theorie stützen (129), derzufolge Ca^{2+}-Ionen während der Nervenerregung eine Konformationsumwandlung von Proteinen bewirken.

Auch die Ergebnisse, die mit dem Präzipitat erhalten wurden, können durch Resultate in der Literatur bekräftigt werden. Im Präzipitat befinden sich nach Dekirmenjan und Lemkey-Johnston sehr viele Mitochondrien**, und nach Graham et al. (29) und Wallach et al. (27) sind viele Proteine der Mitochondrien ß-strukturiert. Tatsächlich lassen die Ergebnisse, die mit dem Präzipitat erhalten wurden, auf einen großen Teil von Proteinen in Faltblattstruktur schließen.

---

* "Axonmembranfraktion" nach Papakostidis

** Diese Aussagen wurden anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gemacht.

7. Zusammenfassung

I. Experimentelles

1. Mittels infrarotspektroskopischer Untersuchungen sollte die Konformation der Proteine in biologischen Membranen und die Abhängigkeit der Konformation von verschiedenen Parametern untersucht werden.

Anhand von IR-Messungen im Transmissionsverfahren war bereits festgestellt worden, daß bei Proteinen in Erythrozytenmembranen, in Mitochondrienmembranen sowie Membranpräparaten aus Rattenhirn unter bestimmten Bedingungen eine Konformationsumwandlung zur ß-Struktur stattfindet.

Diese Beobachtungen wurden an Membranen gemacht, die als Filme auf eine optische Platte (Probenträger) niedergeschlagen wurden. Die Nachteile der Meßmethode mit Filmen sind:

a) Die Filme werden nach Methoden hergestellt, die als unphysiologisch zu werten sind.

b) An solchen Membranfilmen kann das Ionenmilieu nicht gegen ein anderes ausgetauscht werden. Daher können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob stattgefundene Konformationsumwandlungen reversibel sind.

Diese Nachteile sollten umgangen werden. Hierfür wurde auf das FMIR-Meßverfahren zurückgegriffen, welches besonders geeignet für Messungen biologischer Substanzen ist. Prinzipiell dürfen sich Meßergebnisse, die mittels dieses Verfahrens erhalten werden, nicht von den durch Transmissionsmessungen erzielten Ergebnissen unterscheiden. Für das FMIR-Meßverfahren wurde eine Küvette entwickelt, die es ermöglicht, Ionen in den auf Probenträgern befindlichen Membransuspensionen nacheinander auszutauschen. Mittels der FMIR-Küvette, die auch als Dialyseküvette bezeichnet werden kann, können langwierige Dialysen, die sich sonst über mehrere Tage erstrecken, in wenigen Stunden durchgeführt werden.

Die Deuterierung von Membranen kann ebenfalls schnell und unkompliziert durchgeführt werden.

Als weiterer Vorteil ist zu nennen, daß die Membranen für Messungen in der FMIR-Küvette keinen so drastischen Präparationsschritten unterworfen werden müssen, wie sie bei der Filmherstellung für Messungen mit dem Transmissionsverfahren notwendig sind.

2. In unserem Arbeitskreis durchgeführte Messungen mit Membranen aus Rattenhirn - diese wurden fälschlicherweise für Axonmembranen gehalten und als solche deklariert - hatten zu dem Ergebnis geführt, daß viele der darin enthaltenen Proteine in Gegenwart von K^+-Ionen in antiparalleler Faltblattstruktur vorliegen. Die Isolierung der bei den erwähnten Messungen verwendeten Membranen war mittels Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor durchgeführt worden. Nach dieser findet üblicherweise keine Dichtebestimmung der Fraktion statt, von der angenommen wird, daß sie den Hauptteil der Axonmembranen enthalten muß.

Da für FMIR-Messungen größere Substanzmengen als für Transmissionsmessungen benötigt werden, wurde die "rohe Mitochondrienfraktion" P_2 mittels Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor subfraktioniert. - Nach einer Subfraktionierung im Zonenrotor wird stets die Dichte sämtlicher Fraktionen bestimmt. - Mit der Membranfraktion des Dichtebereichs 0,9-1,0 M S, in der sich elektronenmikroskopischer Aufnahmen zufolge der größte Anteil von Axonmembranen befindet, wurde obiges Ergebnis jedoch nicht erhalten.

3. Es mußten nun folgende Fragen geklärt werden.

a) In welcher Membranfraktion befinden sich die meisten Membranen, die in Gegenwart von K^+-Ionen in Faltblattstruktur vorliegen?
b) Wirken sich die beiden Subfraktionierungsmethoden unterschiedlich auf die Konformation der Proteine aus?

c) Gibt es unterschiedliche Ergebnisse, wenn die beiden verschiedenen Meßmethoden, die mit sich stark unterscheidenden Probenvorbereitungen verbunden sind, für die Messungen angewendet werden?

4. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden gegen K^+-Kakodylat-Puffer dialysierte Membranen, die aus verschiedenen Bereichen eines Gradienten nach der Dichtegradientenzentrifugation im Ausschwingrotor stammten, mittels der Transmissionstechnik untersucht. Zusätzlich wurden K^+-Spektren von der "rohen Mitochondrienfraktion" aufgenommen. Von Membranen aus verschiedenen Gradientenbereichen nach der ersten Zentrifugation im Zonenrotor wurden K^+-Spektren mittels beider Meßverfahren aufgenommen.

5. Von Erythrozytenmembranen, Myelin und von verschiedenen Membranfraktionen aus Rattenhirn wurden unter Variation diverser Parameter FMIR-Spektren aufgenommen. Für viele Versuchsreihen wurden deuterierte Membranen verwendet.

II. Resultate

1. Die Antworten auf die unter Punkt I.3 gestellten Fragen lauten:

a) Die beiden unterschiedlichen Subfraktionierungsmethoden wirken sich nicht unterschiedlich auf die Konformation der Proteine aus.

b) Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S besitzen im Vergleich zu den Membranen aus anderen Fraktionen die meisten Proteine in ß-Struktur.

c) Aufgrund der verschiedenen Probenvorbereitungen, die für die Messungen in der FMIR- und Transmissionsküvette notwendig sind, gibt es Konformationsunterschiede. In Membranfilmen befinden sich weniger ß-strukturierte Proteine als in den Membransuspensionen.

2. Der Einfluß vieler Präparationsschritte

Der Vergleich der Spektren der "rohen Mitochondrienfraktion" und der Membranen, die durch Subfraktionierung dieser Fraktion gewonnen wurden, läßt die Schlußfolgerung zu:

Je mehr Arbeitsgänge mit Membranen stattfinden, desto eher können Konformationsumwandlungen stattfinden.

3. Zwischenstrukturen

Bei vielen Versuchen läßt die Lage des Maximums der Amid-I-Bande darauf schließen, daß es eine (oder mehrere) Zwischenstruktur(en) gibt.

4. Der H_2O-D_2O-Austausch bei den verschiedenen Membranen

Im Vergleich zu den anderen Membranen findet bei Myelin der H_2O-D_2O-Austausch am schnellsten statt. Hieraus kann gefolgert werden, daß Myelin mehr Proteine in Zufallsknäuelstruktur als die anderen Membranen besitzt.

5. Der Einfluß verschiedener Ionenmilieus bei pH 7,4 (Kakodylatpuffer) und bei pH 7,2 (physiologische Lösungen) auf die Konformation der Proteine

a) Beim hydratisierten Myelin induzieren K^+- und Na^+ die Bildung von Zwischenstruktur(en)
Beim deuterierten Myelin nimmt antiparallele ß-Struktur in der Reihenfolge $Na^+ \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow K^+$ zu.

b) Bei hydratisierten Erythrozytenmembranen nimmt antiparallele ß-Struktur in Abhängigkeit von den physiologischen Lösungen in der Reihenfolge Na^+-physiologische Lösung $\rightarrow$ K^+-physiologische Lösung $\rightarrow$ physiologische Lösung zu.
Bei hydratisierten Erythrozytenmembranen in Gegenwart von Kakodylat-Puffern nimmt antiparallele ß-Struktur in der Reihenfolge $K^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow Ca^{2+}$ zu. Weiterhin ist bei den deuterierten Erythrozytenmembranen eine Vielzahl von Zwischenstrukturen zu beobachten.
Der H_2O-D_2O-Austausch an Erythrozytenmembranen wird durch Ca^{2+}-Ionen gefördert. Dabei müssen die Ca^{2+}-

Ionen in einer Mindestkonzentration vorliegen.

c) Bei den hydratisierten Membranen aus Rattenhirn ergeben sich nach dem Austausch der K^+- gegen die Na^+-Ionen folgende Ergebnisse:
Gradientenbereich 0,9-1,0 M S: K^+ und Na^+ unterscheiden sich nicht in ihrem Einfluß auf die Konformation der Proteine.
Gradientenbereich 1,0-1,1 M S: Na^+ bewirkt eine Reduzierung der antiparallelen ß-Struktur. Es entstehen mehr Zwischenstrukturen.
Gradientenbereich > 1,2 M S: Na^+ bewirkt eine Verminderung der antiparallelen ß-Struktur, wobei mehr α- und/oder Zufallsknäuelstruktur entsteht.
Bei den in D_2O durchgeführten Versuchen mit Membranen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S ergaben die Versuche mit physiologischen Lösungen ebenfalls, daß mit hauptsächlich K^+-Ionen Faltblattstruktur überwiegt.

Proteine der Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S nehmen in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen überwiegend Faltblattstruktur (parallel und antiparallel)an. Dieser Vorgang ist reversibel. Bei den Proteinen aus den anderen Membranfraktionen induziert Ca^{2+} keine Bildung von ß-Struktur.

6. Der Einfluß verschiedener Temperaturen in Gegenwart verschiedener Kationen bei pH bzw. pD 7,4

a) Beim Myelin hat die Temperaturerhöhung bis 30° C keine Konformationsumwandlungen zur Folge. Ab 50° C ist sowohl mit Na^+ als auch mit K^+ der Beginn einer Konformationsumwandlung zur ß-Struktur (Denaturierung) zu beobachten. Sie findet in Gegenwart der K^+-Ionen in verstärkterem Maße als mit Na^+ statt. Bei 70° C ist die Konformationsumwandlung weiter fortgeschritten. Mit der Konformationsumwandlung der Proteine ist eine Konformationsumwandlung der Kohlenwasserstoff-

ketten verknüpft. Die Umwandlungen sind irreversibel.

b) Bei den Erythrozytenmembranen, die gegen physiologische Lösung, K^+- und Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert wurden, zeigt sich bereits bei 20° C die Zunahme von ß-Struktur. Bei 30° C ist eine weitere Zunahme zu verzeichnen. Mit diesen Umwandlungen, die nicht mit Na^+ zu verzeichnen sind, ist keine Strukturumwandlung der Kohlenwasserstoffketten zu verzeichnen. Die Vorgänge, die ihre Ursache metabolischen Prozessen verdanken, sind voll reversibel.

c) Auch bei den Rattenhirnmembranen des Dichtebereichs 0,9-1,0 M S sind bereits bei 20° C Konformationsumwandlungen zu beobachten. Sie verstärken sich bei 30° C und sie sind ebenso wie die Veränderungen an den Erythrozytenmembranen reversibel. Kationenabhängige Unterschiede bestehen ebenfalls.Bei den hydratisierten Membranen entsteht mit Na^+ und K^+ ß-Struktur, während mit Ca^{2+} eine Zwischenstruktur entsteht. Bei den deuterierten Membranen findet nur mit Ca^{2+} die zusätzliche Bildung von Faltblattstruktur statt.

6. Variation der pH- und pD-Werte an Erythrozytenmembranen

a) Die Erniedrigung der pH-Werte an Erythrozytenmembranen bis auf pH 2,5 hat nur bei den K^+-Eryhtrozytenmembranen eine irreversible Konformationsumwandlung zur ß-Struktur zur Folge.

b) Bei der Variation der pD-Werte an Na^+-, K^+- und Ca^{2+}-Erythrozytenmembranen finden in Gegenwart von Ca^{2+} und K^+ mehr irreversible Konformationsumwandlungen als mit Na^+ statt.

7. Einfluß des Einfrierens und Wiederauftauens bei hydratisierten K^+-Membranen der Gradientenbereiche 1,0-1,1 und 1,2 M S

Bei den Membranen beider Gradientenbereiche bewirkt die als unphysiologisch zu wertende Methode des Einfrierens

und Wiederauftauens die Abnahme von Faltblattstruktur. Dabei ist bei den Membranen aus dem Gradientenbereich 1,0-1,1 M S eine stärkere Verminderung der ß-Struktur zu verzeichnen.

8. Der Einfluß der Dialysenreihenfolge bei K^+ und Na^+-Membranen der Gradientenbereiche 0,9-1,0 und 1,0-1,1 M S

In den Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S sind keine Proteine enthalten, auf deren Konformation Na^+ und K^+ einen unterschiedlichen Einfluß ausüben. K^+ und Na^+ induzieren bei den Membranproteinen des Gradientenbereichs 1,0-1,1 M S unterschiedliche Konformationsumwandlungen. Daher ist der Verlauf der Amid-I-Bande nicht unabhängig von der Dialysenreihenfolge.

ANHANG

Abkürzungen und Bemerkungen

(i) Abkürzungen, welche die Membranen betreffen:

1. Membranen, die gegen Kakodylat-Puffer dialysiert wurden, erhalten den Namen des in ihnen befindlichen Kations, also K^+-, Na^+- und Ca^{2+}-Membranen.
2. Nach der Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer werden die Membranen als Tris-EDTA-Membranen bezeichnet.
3. In H_2O bzw. D_2O befindliche Membranen werden als H_2O- bzw. D_2O-Membranen bezeichnet.

(ii) Abkürzungen, welche die Meßverfahren und die Küvetten betreffen:

1. FMIR = Frustrated Multi Internal Reflections (gehemmte innere Vielfachreflexionen)
2. ATR = Attenuated Total Reflection (Abgeschwächte Totalreflexion
3. FMIR-Küvette = Küvette für FMIR-Messungen
4. Transmissionsküvette = Küvette für Transmissionsmessungen
5. IR = Infrarot
6. CD = Circular Dichroismus
7. ORD = Orbital Resonanz Dichroismus

(ij) Abkürzungen, welche die Spektren betreffen:

1. Intensitätsbezeichnungen: s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach, sh = Schulter
2. Unsymmetrie des Maximums: Unter Unsymmetrie des Maximums wird eine Schulter verstanden, die sich fast auf der Höhe des Maximums befindet.
3. Unter der abgekürzten Sprechweise " ein von .. bis.. verlaufendes Maximum" soll folgendes verstanden werden: Die Bande besitzt kein eindeutig festzulegendes Maximum, sondern maximale Absorption ist von .. bis .. zu beobachten.
4. sym. = symmetrisch
5. asym. = asymmetrisch

(iv) Sonstige Abkürzungen:

TGS = Triglycerolsulfat

S= Saccharose

upm = Umdrehungen pro Minute

SDS = Sodiumdodecylsulfat

Ordinateneinteilung: Die Ordinateneinteilung hat nur symbolischen Charakter. Aus Gründen, die im Kapitel "Experimentelle Schwierigkeiten bei den FMIR-Messungen" erörtert werden (Siehe S. 19), waren keine quantitativen Messungen möglich. Innerhalb der Spektren konnte die Intensität der Banden relativ zueinander verglichen werden.

Zuordnung		Wellenzahl (cm^{-1})			
Schwingung	funktionelle Gruppe	Proteine		Phospholipide	Lit.
C=O Valenz	Ester			1710-1750	(40)
				1720-1740 s	(86,87)
				1740	(88)
				1739	(89)
	nicht ionisierte Carboxylgruppe	1700			(67,94)
		1720			(40)
		1670-1710			(82)
			Konf.		
	Peptid (Amid-I)	1650		1650[a]	(40)
		1635 vs 1655 vs	ß α		(86)
		1652[b] 1628	α ß		(89)
		1652[c]	α, ß		(39)
		1635 sh 1690 sh	ß	1655[a]	
				1640	(83)
		1650-1655[d]	α		(90)
		1625-1630	ß		
CO_2^- asym. Valenz	ionisierte Carboxylgruppe	1570[e]			(88)
		1565			(90,91)

CO_2^- asym. Valenz		1575			(49,60)
		1565-1575			(85)
N-H Deformation	Peptid (Amid-II)	1535[c]		1550[a]	(39)
		1537-1560 s			(40)
		1540-1550	α		(92)
		1520-1525	ß		
				1540[a]	(83)
		1546,1515	α		(68)
CH_2 Deformation	$-CH_2-$			1473-1463[g] vs	(88)
				1460-1470 vs	(93)
				1468	(92)
				1465	(67,40)
				1466	(87)
CH_3 asym. Deformation	$-CH_3$	1453[f]		1463	(88)
				1460	(92)
				1458	(67,40)
				1453 vs	(86)
CH_2 Scheren- od. Nickschwingung	$-(CH_2)_9-$			1440	(83)
CH_2 Deformation	$-C=C-CH_2-$			1435	(83)
CH_2 Scherenschwingung	$-CH_2$			1419	(83)
$N-CH_3$ asym. Deformation	Cholin			1414	(87)

Tab. A 1 (Legende: siehe S.208)

CO_2^- sym. Valenz	ionisierte Carboxyl gruppe	1405 w 1400 1410 1400-1410		(20) (77,90, 91,95) (40) (88)
CH_3 sym. Deformation	$-CH_3$		1376 vs 1378 1377	(86) (83) (87)
CH_2 Nick- oder Torsionsschwingung	$-(CH_2)_9$		1368	(83)
C-N Valenz + N-H Deformation	Peptid (Amid-III)	1300 1250-1300		(40) (93)
OH Deformation	(P)-OH		1280	(96)
	-OH		1374	(88)
P=O Valenz	Phosphordiester		1226 1210-1250 1225[h] 1250-1350 1160-1350[i] 1140-1225[j]	(98) (97) (20,40) (83,89) (99)
C-O-C asym. Valenz	Ester		1230 1250	(40) (83)
PO_2^- asym. Valenz	Phosphatgruppe		1235-1080	(99)

C-O-C sym. Valenz	Ester	1170 1172	(40) (87)
C-O-(P) asym. Valenz (aus der Phase)	Ester	1105	(87)
C-O-(P) Valenz	Ester	1093	(87)
C-C Gerüstschwingungen		1060-1050 s 1074	(40) (83)
C-O-(P)	Ester	1093	(97)
PO_2^- sym. Valenz	Ester	1090-1040 1075 1090-1000 s	(82) (87,100) (99)
C-O-(P) sym. Valenz (in Phase)		1048 1070 1063	(87) (98) (102)
C-O Valenz	HO-Cholesterin	1050	(83)
P-O-(C) Valenz	Ester	1050-980 s 1060	(86) (96)

Tab A 1 (Legende: siehe S. 208)

Legende zu Tab.A 1: Zuordnung der im Wellenzahlenbereich 1800-1000 cm^{-1} auftretenden IR-Banden von Membranen. Unberücksichtigt blieb hierbei eine Bandenserie, die auf CH_2-Nickschwingungen zurückzuführen ist und sich häufig mit den Banden der P-O-Valenzschwingung und PO_2^- asymmetrischen Valenzschwingung überlagert. Diese Bandenserie verläuft von 1315 bis ca. 1190 cm^{-1}. Außer den Banden der Proteine und Phospholipde werden auch die Banden des Cholesterins (Lipid) aufgeführt. Cholesterin spielt eine wichtige Rolle im Myelin, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Abkürzungen: Konf.: = Konformation; asym. = asymmetrisch; sym. = symmetrisch. Die Abkürzungen für die Bandenintensitäten sind dem Kapitel "Abkürzungen" zu entnehmen.

Erläuterungen: [a] bedingt durch Sphingomelin; [b] bei Erythrozytenmembranen; [c] bei Ehrlich Ascites-Carcinoma; [d] bei Copolymeren von L-Glutaminsäure und L-Lysin; [e] bei Glutatin- und Asparaginsäure; [f] bei Alanin; [g] Doppelbande; [h] bei Ehrlich Ascites Carcinoma und Erythrozytenmembranen; [i] nicht gebunden; [j] gebunden

Symbole: ⫽ = antiparallel ; ß = Faltblattstruktur; ∝ = Helix, ∂ = Zufallsknäuelstruktur

	Messungen in H_2O Wellenzahlen cm^{-1}						Messungen in D_2O Wellenzahlen cm^{-1}					
Ion	K^+			Na^+			K^+		Na^+		Ca^{2+}	*
Temperatur °C	20	50	70	20	50	70	20	20	20	20	20	20
Verfahren	b	b	b	b	b	b	b	a	b	a	a	b
Zuordnung												
C=O Valenz	1737sh 1725m 1712sh	1740sh	1740sh	1737sh 1725m 1712sh	1740sh	1740sh	1725m	1735m 1722m	1725m	1735m 1727m	1735m 1727s	1725m
Amid-I	1652s 1647sh	1690sh 1652sh 1640s 1630sh	1690sh 1655sh 1640-1635 s	1652s 1647sh	1690sh 1645s 1635sh	1690sh 1655sh 1642s	1648s 1637sh	1650s 1637sh	1648s 1637sh	1650s 1637sh	1650s 1637sh	1648s 1637sh
CO_2^- asym. Valenz	-	-	-	-	-	-	1580m	1577w	1580w	1577w	1577w	1580w
Amid-II	1562sh 1545s 1515sh	1562sh 1545m 1515sh	1545m	1562sh 1545s 1515sh	1562sh 1545m 1515sh	1547s	1545w** 1515vw	1545w** 1515sh	1545w** 1515vw	1545w** 1515vw	1545s** 1515sh	1545w** 1515vw
CH_2-Deformation	1467m	1465m	1465m	1467m	1467m	1467m	1465s	1467s	1465s	1467s	1467s	1465s
CO_2^- sym. Valenz	1405sh	1400w	1400sh	1405sh	1400w	1400w	1405w	-	1405w	1405w	-	1405w

CH_3 sym. Deformation	1377m	1377w	1377w	1377m	1380w	1380w	1382w	1380w	1382w	1380sh	1380sh	1382w
CH_2 Torsionsschwingung	1365w	1365w	1365sh	1365w	1365sh	-	1368w	1365sh	1368w	1365sh	1365sh	1368w
P=O Valenz	1225m	1220m	1220m 1237sh	1225m	1220m	1220m	-	-	-	-	-	-
C-O-C sym. Valenz	1170sh	1170w	1165m	1170sh	1170w	-	-	-	-	-	-	-

Tab. A 2: Zusammenstellung von Absorptionsbanden, die bei den Meßserien mit Myelin auftraten. Es wurden Messungen mit reinem Myelin in H_2O und D_2O durchgeführt und solchem, welches zuvor gegen die diversen Puffer dialysiert worden war. Die verwendeten Puffer besaßen den pH- oder pD-Wert 7,4. Für die Versuche mit deuteriertem Myelin, wurde das Myelin nach zwei verschiedenen Dialyseverfahren gegen die Puffer dialysiert. Die Methoden sind auf Seite 48 nachzulesen.

Alle Messungen wurden bei 20° C durchgeführt.
* Es handelt sich um einen Tris-EDTA-Puffer
** Es handelt sich um die Amid-I-Bande von Proteinen, bei denen ein H_2-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat.

	Messungen in H_2O							Messungen in D_2O		
	Wellenzahlen cm^{-1}							Wellenzahlen cm^{-1}		
Ion	a)	b)	c)	d)	K^+	Ca^{2+}	Na^+	K^+	Na^+	Ca^{2+}
pH-Wert	7,0	7,2	7,2	7,2	7,4	7,4	7,4	7,34	7,4	7,4
Zuordnung										
C=O Valenz	1737sh	1737sh	e)	1740w 1725m	e)	e)	e)	1735m 1732- 1719 }m	1735m 1719m	1737m 1732- 1715 }m
Amid-I	1685sh 1645s 1635sh	1685sh 1645s 1632sh	1685sh 1652- 1637 }s 1630sh	1685sh 1655sh 1645s	1690sh 1652sh 1645s 1635sh	1690sh 1655sh 1645s 1635sh	1690sh 1655sh 1647s 1635sh	1687sh 1655sh 1647s 1640s 1630sh	1690sh 1655sh 1647s 1638s 1630sh	1687sh 1656sh 1650s 1641s 1630sh
CO_2^- asym. Valenz	-	-	-	-	-	-	-	1590- 1556 }m	1590- 1557 }m	1580s
Amid-II	1542m	1542m	1545m	1545m	1542m	1545m	1550sh 1542m	1545s* 1512sh	1555sh* 1545s 1535sh 1515sh	1555sh* 1545w 1515sh
CH_2 Deformation	1465m	1465m	1465m	1465m	1463m	1465w	1465w	1465m	1465m	1462m
CH_3 asym. Deformation	1455w	1455ww	1455vw	1455vw	1455w	1456w	1457w	1458m	1457m	1457m

CO_2^- sym. Valenz	1390m	1395m	1390m	1392m	1392m	1395m	1395m	1395w	-	1400sh
CH_3 sym. Deformation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P=O Valenz	1220m	1225m	1225m	1225m	1220m	1225m	1225m	-	-	-
C-O-C sym.	1180-1137 w	1175-1132 w	1180-1132 w	1180-1132 w	1180-1135 w	1177-1132 w	1172-1135 w	-	-	-

Tab. A 3: Zusammenstellung von Absorptionsbanden in den Spektren von Erythrozytenmembranen. In allen Fällen waren die Erythrozytenmembranen nach abgeschlossener Präparation abzentrifugiert worden(1 h/100 000 g). Sie wurden dann in die FMIR-Küvette gefüllt und nacheinander gegen die gewünschten Puffer dialysiert. Die Messungen fanden jeweils bei 20° C statt.

Bemerkungen: Wenn in den Spalten nur Buchstaben angegeben sind, waren die Erythrozytenmembranen entweder gegen H_2O oder gegen die physiologischen Lösungen dialysiert worden. (Zu den physiologischen Lösungen Vgl. S. 47)

Zeichenerklärung:
a) = H_2O; b) = physiologische Lösung; c) = K^+-physiologische Lösung; d) = Na^+-physiologische Lösung
e) Die genaue Lage der Schulter, die der C=O-Valenzschwingung zuzuordnen ist, kann nicht angegeben werden.
* Es handelt sich um die Amid-II-Bande der Proteine, bei denen der H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat.
- = Die Bande ist verdeckt

Wellenzahlen cm^{-1}

Zuordnung Ion		Amid-I		Amid-II		CO_2^- sym.Valenz	
		K^+	Na^+	K^+	Na^+	K^+	Na^+
pH-Wert K^+	pH-Wert Na^+						
7,4	7,4	1655sh 1647s 1635sh	1655sh 1647s 1637sh	1545m 1515sh	1545m	a)	1395m
6,4	6,4	1690sh 1657sh 1647s 1635sh	1680sh 1655sh 1647s 1637sh	1545m 1515sh	1545m	a)	1395m
5,4	5,4	1690sh 1650s 1635sh	1680sh 1655sh 1647s 1637sh	1545m 1515sh	1545m	a)	1395m
4,42	4,4	1645s	1655sh 1647s 1635sh	1547m 1515sh	1545m	a)	1395m
4,04	4,06	1690sh 1655sh 1647s 1632sh	1655sh 1647s 1635sh	1565sh 1546m 1515sh	1545m 1515sh	a)	1392m
3,5	3,54	1690sh 1655sh 1647s	1655sh 1647s 1635sh	1546m 1515sh	1545m 1515sh	b)	1387m[e]
3,04	3,08	1690sh 1655sh 1647s	1685sh 1655sh 1647s 1637sh	1547sh 1542m 1515sh	1545m 1515sh	c)	1387m[e]
2,56	2,54	1690sh 1647s 1635sh	1680sh 1654sh 1647s 1630sh	1547sh 1542m 1515sh	1565sh 1545m 1515sh	c)	1380m[f]
7,4	7,4	1680sh 1655sh 1645s 1635sh	1680sh 1655sh 1647s 1637sh	1547s 1515sh	1545m	d)	1395

Tab. A 4: Zusammenstellung der Banden, bei denen sich die grössten Veränderungen bei der Variation der pH-Werte sind. Die Dialysen gegen die verschiedenen Puffer fanden in der Reihenfolge statt, wie sie in der Tabelle von oben nach unten angegeben ist.

Zeichenerklärung: a) Bei diesen pH-Werten ist keine Schulter für die CO_2^- sym. Valenzschwingung sichtbar. b) Die Absorption bei 1395cm^{-1} nimmt ab. c) Die Absorption wird noch geringer. d) Die Bande hat fast ihren ursprünglichen Verlauf wieder.

e) Die Verschiebung der Bande nach 1387 cm^{-1} kann mit einer Abschwächung der CO_2^- sym. Valenzschwingung erklärt werden

f) Die Bande der CH_3 sym. Deformationsschwingung ist freigelegt.

Ion	Wellenzahlen cm^{-1} K^+					Wellenzahlen cm^{-1} Na^+					
pD-Wert	7,34	3,46	3,1	4,06	7,34	7,4	3,5	3,0	2,5	2,0	7,0
Zuordnung											
Amid-I	1687sh 1655sh 1647s 1640s	1685sh 1655sh 1647s 1640s 1632sh	1685sh 1654sh 1650- 1640 }s 1632sh	1680sh 1655sh 1650- 1640 }s 1632sh	1680sh 1655sh 1650s 1640s 1632sh	1685sh 1655sh 1647s 1638s 1630sh	1685sh 1655sh 1647s 1641s	1685sh 1652sh 1647s 1641s 1630sh	1655sh 1650- 1640 }s	1685sh 1655sh 1648s 1641s 1631sh	1685sh 1655sh 1648s 1641s 1631sh
CO_2^- asym. Valenz	1582- 1556 }m	1575m	1582m	1582m	1580m	1580- 1557 }m	1580m	1580m	1580m	1578m	1578m
Amid-II*	1542m 1512sh	1545m 1515sh	1547m 1535sh 1515sh	1547m 1535sh 1515sh	1545m 1535sh 1513sh	1555sh 1546m 1535sh 1515sh	1547m 1535sh 1515w	1545m 1535w 1515w	1547m 1515w	1547m 1515w	1555sh 1547m 1535w 1515w
D_2O-Scherenschwingung	1200s	1205s	1206s	1205s		1205s	1205s	1205s	1205s	1205s	1205s

Tab. A 5: Zusammenstellung der Banden, an denen sich die größten Veränderungen bei der Variation der pD-Werte bei K^+- und Na^+-Erythrozytenmembranen zeigten. Die Dialysen gegen die verschiedenen Puffer fanden in der Reihenfolge statt, wie sie an der Auflistung der pD-Werte von links nach rechts zu entnehmen ist.

Erklärung: *Es handelt sich um die Amid-II-Bande der Proteine, bei denen der H_2O-D_2O-Austausch nicht oder nur unvollständig stattgefunden hat.

	Messungen in H_2O Wellenzahlen cm^{-1}			Messungen in D_2O Wellenzahlen cm^{-1}			
Verwendete Fraktion	a)	b)	c)	b)	c)	d)	e)
Zuordnung							
C=O Valenz	1732s	1732s	1732s	1730m	1740s 1727sh	1740m	1725s
Amid-I	1648s 1690sh	1648s 1632sh	1648s 1632sh 1690sh	1650s 1635sh 1685sh	1642s 1685sh	1650s	1655- 1630 } s 1682sh
CO_2^- asym. Valenz	-	-	-	1577m	1582m	-	1582sh
Amid-II	1544s 1528sh	1540s	1542s	1550m 1515w	1547w 1532sh 1512w	1547s 1432sh 1512sh	1542m 1512w
CH_2 Deformation	1460s	1460s	1460w	1467sh	1467sh	1467sh	1467sh
CH_3 asym. Deformation	1448sh	1448sh	1450w	-	1455sh	-	-
CO_2^- sym. Valenz	1394m	1390m	1392m	-	-	-	-
CH_3 sym. Deformation	1376m	-	-	-	-	1380sh	-

P=O Valenz	1220m	1226m	1226m	-	-	-	-
C-O-C sym. Valenz	1164w	1164m	1142m	-	1160w	1170w	1172w

Tab. A 6: Zusammenstellung von Absorptionsbanden in den Spektren von Membranen aus Rattenhirn. Die Membranen wurden, wie auf Seite 27 beschrieben, präpariert und anschließend im Ausschwingrotor subfraktioniert (Vgl. S.35) Anschließend erfolgten in Dialyseschläuchen die Dialysen gegen 1. Tris-EDTA-, 2. K^+-Kakodylat-Puffer (Vgl. S. 48). Für die D_2O-Spektren wurden die Membranen entsprechend des unter 2.2.3 beschriebenen Verfahrens deuteriert, welches bei Verwendung der Transmissionsküvette Anwendung findet.*

Zu den verwendeten Fraktionen: a) 0,8-1,0 M S; b) 1,0-1,1 M S; c)>1,1 M S d) "rohe Mitochondrienfraktion"; e) Präzipitat nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Zeichenerklärung: - Banden treten entweder nicht auf, oder sie sind verdeckt.

* Die Membranen wurden in keinem der Versuche osmotisch geschockt.

	Messungen in H_2O Wellenzahlen cm^{-1}					Messungen in D_2O Wellenzahlen cm^{-1}				
Ion	K^+	Na^+	K^+	K^+	Na^+	K^+	Na^+	K^+	K^+	Na^+
Verwendete Fraktion	e)	e)	c)	c)	c)	e)	e)	c)	c)	c)
Osmotischer Schock	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Zuordnung										
C=O Valenz	1740m	1732m 1716m	1740m 1715sh	1740m 1730m 1715m	1735m 1717m	1734m 1725m	1737m	1740m 1725m	1740m 1727m	1737m
Amid-I	1687sh 1655sh 1645s	1652s	1652s 1635sh	1695sh 1652s 1635sh	1652s 1635sh	1690sh 1640s 1632sh	1655s 1635sh	1680sh 1642s 1632sh	1680sh 1657sh 1642s	1690sh 1652s 1635sh
CO_2^- asym. Valenz	-	-	-	-	-	1580m	-	1575w	1575w	-
Amid-II	1562sh 1545s 1515sh	1557sh 1542s 1530sh	1566sh 1545s 1515sh	1548s 1542s 1528sh 1515sh	1540s 1528sh 1515sh	1545m 1512w	1545m 1515w	1552s	1552s	1552s
CH_2 Deformation	1465w	1462w	1466m	1463w	1464w	1462sh	1467m	1467m	1467m	1467m
CH_3 asym. Deformation	1452m	1455m	1452m	1455m	1455m	-	-	-	-	-
CO_2^- sym. Valenz	1392m	1397m	1394m	1395m	1395w	1400w	1413-1372 m	1420-1350 m	1417-1350 m	1420-1350 m

P=O Valenz	1235w	1237w	1234w	1237w	1237w	-	1237m	-	-	-
C-O-C sym. Valenz	1172w	1168w 1152w	1168w	1169w	1168w 1152w	1160w	1155w	1160w	1160w	1152w 1165w

Tab. A 7: Zusammenstellung von Absorptionsbanden in den Spektren von Membranen aus Rattenhirn. Die Membranen wurden, wie auf Seite 27 beschrieben, präpariert und anschließend im Ausschwingrotor subfraktioniert. Daraufhin wurde in einigen Fällen ein osmotischer Schock durchgeführt. In anderen Fällen unterblieb die Lysis. Danach erfolgten in Dialyseschläuchen nacheinander die Dialysen gegen 1. Tris-EDTA-, 2. K^+-Kakodylat- oder Na^+-Kakodylat-Puffer. Für die D_2O-Spektren wurden die Membranen entsprechend des unter 2.2.3 beschriebenen Verfahrens deuteriert, welches bei Verwendung der Transmissionsküvette Anwendung findet.

Zu den verwendeten Fraktionen: c)>1,1 M S; e) Präzipitat nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Zeichenerklärung: + steht für ja, - steht für nein. Wird dieses Zeichen bei den Banden verwendet, so sind die Banden entweder verdeckt, oder sie treten nicht auf.

Wellenzahlen cm^{-1}

Ion	K^+	K^+	K^+	K^+	Na^+	Na^+	Na^+	Na^+	K^+	Na^+
Fraktion	II	II	IV	IV	II	II	IV	IV	I	I
Küvette	F	T	F	T	F	T	F	T	T	T
Zuordnung										
C=O Valenz	1738s 1720sh	1735s 1729s	1740m	1737s 1732s 1715m	1742s	1737s 1731s	1740s 1730s	1735s 1715sh	1736s 1731s	1737s 1731s
Amid-I	1680sh 1655sh 1637s	1682sh 1647s 1631sh	1680sh 1647s 1630sh	1690sh 1652s 1637sh	1690sh* 1655sh 1645-1642 s	1655s	1680sh 1650s 1630sh	1680sh* 1655s* 1630sh	1685sh 1652s 1635sh	1685sh 1652s 1635sh
CO_2^- asym. Valenz	-	-	-	-	-	-	-	1570sh	1573sh	1573sh
Amid-II	1547s	1559sh 1537s 1515sh 1502sh	1552sh 1540s	1547sh 1540s	1545s 1515sh	1559sh 1545s 1519sh	1545s	1547s 1515sh	1547s 1540s 1515sh 1505sh	1547s 1540s 1515sh 1505sh
CH_2 Deformation	1462m	1462m	1463m	1461m	1462m	1465m	1465m	1461m	1462m	1464m

CH_3 asym. Deformation	1452m	1452m	1455m	1454m	1457m	1452m	1456m	1454m	1454m	1454m
CO_2^- sym. Valenz	1395m	1390m	1395m	1392m	1395m	1395m	1395m	1392m	1392m	1392m
CH_3 sym. Deformation	-	-	-	-	-	-	-	-	1380w	1380w
P=O Valenz	1237m	1240sh 1227m	1237m	1228m	1237m	1240m 1230sh	1245sh 1232m	1232m	1235m	1230m
C-O-C sym. Valenz	1180-1130 m	1167w	-	1170w	-	1167w	-	1170w	1169w	1167w 1155w

Tab. A 8: Zusammenstellung von Banden aus H_2O-Spektren von Membranen, die mittels Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor voneinander getrennt wurden. Verwendet wurden die nicht osmotisch geschockten Membranen der Gradientenbereiche 0,9-1,0; 1,0-1,1; >1,2 M S. Es wurden Messungen mittels des FMIR- und mittels des Transmissions-Verfahrens durchgefürht.

Erläuterungen zu den Fraktionen: I = 0,9-1,0 M S; II = 1,0-1,1M S; IV =>1,2 M S

Erläuterungen zum Ionenmilieu: Die Ionen, die in der Tabelle aufgeführt werden, waren in den entsprechenden Kakodylat-Puffern enthalten.

Abkürzungen: F = FMIR-Küvette; T = Transmissionsküvette

Zeichen: - steht für Banden, die entweder nicht vorhanden oder verdeckt sind.

* Es handelt sich um sehr schwache Schultern

Ionenmilieu	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	a)	b)	c)	b)	c)
	Wellenzahlen cm^{-1}							
Fraktion	I	II	III	II	II	II	III	III
Zuordnung								
C=O Valenz	1722m	1727sh 1720m	1728m	1737m 1722m	1740m 1725m	1737m 1727m	1735m 1725m	1737m 1725m
Amid-I	1680sh 1655sh 1640s	1680sh 1655sh 1645s 1635sh	1680sh 1655sh 1645s 1635sh	1655sh 1647-}s 1640 ∫	1680sh 1650sh 1640s	1680sh 1645s 1630sh	1680sh 1655sh 1647sh* 1640s	1680sh 1655sh 1647s 1640sh
CO_2^- asym. Valenz	1580m 1570m	-	1580sh	1576w	1577w	1575w	-	-
Amid-II	-	1550m 1512sh	1550m 1512sh	1562sh 1550m 1515sh	1562sh 1545m 1515w	1550m 1512sh	1545m 1515sh	1560sh 1545m 1515sh
CH_2 Deformation	1467sh	1467sh	1465sh	1467s	1467s	1467s	1465s	1467s
CH_3 asym. Deformation	-	1457sh	-	1460s	1460s	1457sh	1460s	1457s
CO_2^- sym. Valenz	1397m	1400m	1400m	1400m	1400m	1400m	1400m	1400m
C-O-C sym. Valenz	1155sh	1152sh	1152sh	-	-	-	-	-

Tab. A 9: Zusammenstellung von Banden aus D_2O-Spektren von Membranen aus Rattenhirn, die mittels Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor voneinander getrennt wurden. Verwendet wurden nicht osmotisch geschockte Membranen der Gradientenbereiche 0,9-1,0; 1,0-1,1; 1,1-1,2 M S. Die Messungen wurden mittels des FMIR-Verfahrens durchgeführt. Die Temperatur bei den Messungen betrug 20° C.

Erläuterungen zu den Fraktionen: I = 0,9-1,0 M S; II = 1,0-1,1 M S; III = 1,1-1,2 M S.

Erläuterungen zum Ionenmilieu: Ca^{2+}: Die Membranen waren gegen Ca^{2+}-Kakodylat-Puffer dialysiert worden.

a) Die Membranen waren gegen physiologische Lösung dialysiert worden.

b) Die Membranen waren gegen K^+-physiologische Lösung dialysiert worden.

c) Die Membranen waren gegen Na^+-physiologische Lösung dialysiert worden.

Zu den Puffern Vgl. S. 47.

*Die Schulter war sehr schwach.

Saccharosemolarität des Gradientenbereichs	Küvette	Zustand*	Amid-I Wellenzahlen cm^{-1}	Amid-I' Wellenzahlen cm^{-1}	vorherrschende Konformation
0,9-1,0	F	Tris-EDTA	1680 sh 1655 sh 1645 s 1635 sh		$\xi > \beta\# = \alpha/\sigma$
0,9-1,0	T	K^+	1685 sh 1652 s 1635 sh		$\alpha/\sigma > \beta\#$
0,9-1,0	F	K^+	1680 sh 1640 s 1630 sh		$\xi > \beta\#$
0,9-1,0	T	Na^+	1685 sh 1652 s 1635 sh		$\alpha/\sigma > \beta\#$
0,9-1,0	F	Na^+	1680 sh 1640 s 1630 sh		$\xi > \beta\#$
0,9-1,0	F	Ca^{2+}		1687 sh 1655 sh 1640 s	$\beta\# \gg \alpha/\sigma$
0,9-1,0	F	Na^+		1642 s 1654 sh	$\beta\| > \alpha/\sigma$

1,0-1,1	T	K^+	1682 sh 1647 s 1631 sh		$\xi > \beta\#(\parallel)$
1,0-1,1	F	K^+	1680 sh 1655 sh 1637 s		$\beta\#(\parallel) > \alpha/\sigma$
1,0-1,1	T	Na^+	1655 s		α/σ
1,0-1,1	F	Na^+	1690 sh (vw) 1655 sh** 1645-}s 1642 }		$\xi \gg \beta\# = \alpha/\sigma$
1,0-1,1	F	Ca^{2+}		1680 sh 1655 sh 1645 s 1635 sh	$\xi > \alpha/\sigma > \beta\#$
1,0-1,1	F	phys.L.		1655 sh 1647-}s 1640 }	$\xi = \beta\parallel > \alpha/\sigma$
1,0-1,1	F	Na^+-phys.L.		1680 sh 1647-}s 1640 }	$\xi = \beta\parallel \gg \alpha/\sigma$
1,0-1,1	F	K^+-phys.L.		1680 sh 1655 sh 1640 s	$\beta\# \gg \alpha/\sigma$

Tab. A 10 (Legende: siehe S. 227)

1,1-1,2	F	Ca^{2+}		1680 sh 1655 sh 1645 s 1635 sh	$\xi > \alpha/\sigma > \beta\#$
1,1-1,2	F	Na^{+}-phys.L.		1680 sh 1655 sh 1647 s 1640 sh	$\xi > \beta\# > \alpha/\sigma$
1,1-1,2	F	K^{+}-phys.L.		1680 sh 1655 sh 1647 sh(vw) 1640 s	$\beta\# > \xi \gg \alpha/\sigma$
>1,2	T	K^{+}	1690 sh 1652 s 1637 sh		$\alpha/\sigma > \beta\#$
>1,2	F	K^{+}	1680 sh 1647 s 1630 sh		$\xi > \beta\#$
>1,2	T	Na^{+}	1680 sh (vw) 1655 s 1630 sh (vw)		$\alpha/\sigma \gg \beta\#$
>1,2	F	Na^{+}	1680 sh 1650 s 1630 sh		$\alpha/\sigma > \beta\#$

1,0-1,1	F	Na^+		1655 sh 1645 s	ζ » α/σ
1,1-1,2	F	Na^+		1645 s 1655 sh	ζ » α/σ

Tab. A 10: Vorherrschende Proteinkonformation in Abhängigkeit verschiedener Ionenmilieus. Die Membranen waren mittels einer Dichtegradientenzentrifugation im Zonenrotor subfraktioniert worden. Die in der Tabelle erfaßten Ergebnisse wurden mit nicht lysierten Membranen erzielt.

Abkürzungen: T = Transmission, F = FMIR, phys.L. = physiologische Lösung

Zeichenerklärung: α= Helix; σ= Zufallsknäuel; ß = Faltblattstruktur; // = parallel; $\#$ = antiparallel; ζ = Zwischenstrunktur; / = zeigt das Verhältnis an; > steht für etwas stärker, » steht für viel stärker.

* Es wird angegeben, gegen welches Ionenmilieu die Membranen dialysiert wurden.

** etwas an der niederfrquenten Seite verbreitert gegenüber der Bande im Spektrum der Membranen des Gradientenbereichs 0,9-1,0 M S

Literatur:

(1) Overton, E.: Vjschr.Naturforschung (Ges. Zürich) 40, 159 (1895)

(2) Davson, H., Danielli, J.F.: "The Permeability of Natural Membranes" 2nd ed. S. 55, II Cambridge Univ. Press London, New York (1952)

(3) Stein, W.D., Danielli, J.F.: Discuss.Faraday Soc. 21, 263 (1956)

(4) Robertson, J.D.: J.Biophys.Biochem.Cytol. 3, 1043 (1957)

(5) Robertson, J.D.: Biochem.Soc.Symp. 16, 19 (1959)

(6) Robertson, J.D.: "Cellular Membranes in Development" (Ed. M. Locke), Academic Press New York-London, S. 1 (1964)

(7) Nachmansohn, D., Neuman, E.: Ann.N.Y.Acad.Sci. 227, 275 (1974)

(8) Vanderkooi, G., Green, D.,E.: Proc.Natl.Acad.Sci. 66 615 (1970)

(9) Finean, J.B.: Sub.Cell.Biochem. 1, 363 (1972)

(10) Smythies, J.R., Bedington, F., Bradley, R.J., Bridgers, W.F., Morin, R.D.: J.theor.Biol. 43, 29 (1974)

(11) Stoeckenius, W.: Berichte der Bunsengesellschaft für physikal. Chemie 71, 758 (1967)

(12) Korn, E.D.: J.General Physiology 52, 257 (1968)

(13) Green, D.E., Perdue, J.F.: Ann.N.Y.Acad.Sci. 137, 667 (1966)

(14) Lenard, J., Singer,S.J.: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 56, 1828 (1966)

(15) Wallach,D.F.H., Zahler, P.F.: Proc.Natl.Acad.Sci. 56, 1552 (1966)

(16) Singer, S.J.:Ann.N.Y.Acad.Sci. 195, 16 (1972)

(17) Wallach, D.F.H.: "The Dynamic Structure of Cell Membranes", S. 183, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1971)

(18) Gulik, T., Krzywicki, T.: BBA 415, 1 (1975)

(19) Singer, S.J.: J.Col.Interface Science 58, 452 (1977)

(20) Maddy, A.H., Malcolm, B.R.: Science 150, 1616 (1965)

(21) Maddy, A.H., Malcolm, B.R.: Science 153, 212 (1966)

(22) Choules, G.L., Björklund, R.F.: Biochemistry 9, 4759 (1970)

(23) Hendler, R.W.: Phys.Review 51, Nr. 1 (1971)

(24) Jirgensons, B., Hnilica, L.S.: BBA 109, 241 (1965)

(25) Snatzke, F., Snatzke, G.: Z.Anal.Chem. 285, 97 (1977)

(26) Masotti, L., Urry, D.W., Krivacic, J.R., Long, M.M.: BBA 266, 7 (1972)

(27) Wallach, D.F.H., Fernbach, G.R.: Arch.Biochm.Biophys. 131, 322 (1969)

(28) Graham, J.M., Wallach, D.F.H.: BBA 123, 225 (1969)

(29) Graham, J.M., Wallach, D.F.H.: BBA 241, 180 (1971)

(30) Tasaki, I.: "Nerve Excitation - A Macromolecular Approach", C.C. Thomas, Publ. Springfield, Illinois, U.S.A. (1968)

(31) Blumenthal, R., Changeux, J.-P., Lefever, F.: C.R. Acad.Sc. Paris 270, 389 (1970)

(32) Katz, B.: "Nerv, Muskel und Synapse", Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)

(33) Hille, B.: Fed.Proc. 34, 1318 (1975)

(34) Goldman, D.E.: Berichte der Bunsengesellschaft für physiologische Chemie 71, 799 (1967)

(35) Hill, T.L., Yi-der Chen: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 66, 607 (1970)

(36) Neumann, E., Nachmansohn, D., Katchalsky, A.: Proc. Natl.Acad.Sci. 70, 727 (1973)

(37) Tasaki, I., Warashina, A.: Photochemistry and Photobiology 24, 191 (1976)

(38) Green, D.H., Salton, M.R.J.: BBA 211, 139 (1970)

(39) Wallach, D.F.H., Zahler, P.H.: Proc.Natl.Acad.Sci: 56, 1552 (1966)

(40) Wallach, D.F.H., Zahler, P.F.: BBA 150, 186 (1968)

(41) Lynn, J., Fasman, G.D.: B.B.Research Com. 33, 327 (1968)

(42) Davidson, B., Fasman, G.: Biochemistry 6, 1616 (1967)

(43) Papakostidis, G., Zundel, G., Mehl, E.: BBA 288, 277 (1972)

(44) Papakostidis, G.: Dissertation, München (1972)

(45) Krohmer, R., Duelli, R.: "Aus der Praxis für die Praxis", 35 UR, Juli 1967 (Tips von Perkin Elmer)

(46) Fahrenfort, J.: Spectochimica Acta 17, 698 (1961)

(47) Müller-Mohnssen, H., Albrecht-Bühler, G.: Pflügers Archiv Ges. Physiol. 305, 65 (1969)

(48) Timasheff, S., Susi, H.: J.Biol.Chem. 241, 249 (1966)

(49) Blout, E.R., Lozé E., Asadourian, C.: Jacs 83 1895 (1961)

(50) Spectroscopy Data Sheet: Part No. 186-0055, Sheet: No. D - 406, Instrument Division - Perkin Elmer Corporation, Norwalk, Conneticut

(51) Zundel, G., Murr, A., Schwab, G. M.: Z.Naturforschung 17 a, 1027 (1962)

(52) Zundel, G.: "Hydratation and Intermolecular Interaction", Academic Press, New York (1969), Mir, Moskau (1972)

(53) Lindemann, R.: Dissertation, München (1976)

(54) Hofmann, K.P., Zundel, G.: Rev.Scientific Instr. 42, 1727 (1971)

(55) Hofmann, K.P.: Dissertation, München (1972)

(56) Stokes, R.H., Robinson, R.A.: Ind.Eng.Chem. 41, 2013 (1949)

(57) Burger, S.T., Fuji, T., Hanahan, D.J.: Biochm.J. 7, 3682 (1968)

(58) Cotman, E., Mahler, C.W., Anderson, N.G.: BBA 163, 272 (1968)

(59) Whittaker, V.P.: Biochem. J. 73, 694 (1959)

(60) Dekirmenjan, H., Brunngraber, E.G.: BBA 177, 1 (1969)

(61) Lemkey-Johnston, N., Dekirmenjan, H.: Exp. Brain Res. 11, 392 (1970)

(62) Shapira, R , Binkley, F., Kibler, R.F., Wundram, I.J.: P.S.E.B.M. 133, 238 (1970)

(63) Wilcox, H. G.:, Davis, D.V.: Heimberg, M.: BBA 187, 147 (1969)

(64) Cotman, C., Blank, M.L., Moehl, A., Snyder, F.: Biochemistry 8, 4606 (1969)

(65) Chervenka, C.H., Elrod, L.H.: "A Manual of Methods for Large Scale Zonal Centrifugation, Published by Spinco Division of Beckman Instuments, Inc., Palo Alto, California

(66) Hughes, J.: Brain Res. 88, 295 (1975)

(67) Miyazawa, T.:"Poly-α-Amino-Acids", (Ed. Fasman, C.D.) Marcel Dekker, Inc., New York (1967)

(68) Miyazawa, T.: J.Chem.Phys. 32, 1647 (1960)

(69) Miyazawa, T., Blout, E.R.: Jacs 83, 712 (1961)

(70) Karlson, P: "Biochemie", Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1967)

(71) Susi, H., Timasheff, S.N., Stevens, L.: J.Biol.Chem. 242, 5460 (1967)

(72) Krimm, S.: J.Mol.Biol. 4, 528 (1962)

(73) Fasman, G.D., Potter, J.: B.B.Res.Com.: 27, 209 (1967)

(74) Fraser, R.D.B., Harrap, B.S., MacRae, T.P., Stewart, F.H.C., Suzuki, E.: J.Mol.Biol. 14, 423 (1965)

(75) Parker, K.D., Rudall, K.M.: Nature 179, 96 (1957)

(76) Yahara, I., Imahori, K.: J.Amer.Chem.Soc. 85, 230 (1963)

(77) Susi, H.: "Structure and Stability of Biological Macromolecules", Bd. 2, S. 575 (Ed. Timasheff, S.N., Fasman, G.D.), Marcel Dekker, Inc., New York (1969)

(78) Astbury, T.W., Dickinson, S., Bailey, K.: Biochem. J. 29, 2351 (1935)

(79) Smith, R.: BBC 491, 581 (1977)

(80) Pauling, L., Corey, R.B.: Proc.N.A.S. 37, 729 (1951)

(81) Chapman, D., Kamat, R.J.: Science 160, 316 (1968)

(82) Bellamy, L.J.:"The Infra-red Spectra of Complex Molecules", Methuen and Co. Ltd, London (1975)

(83) Chapman, D.: "The Structure of Lipids by Spectroscopic and X-Ray Techniques", Methuen and Co. Ltd., London (1965)

(84) Borsdorf, R., Scholz, M.:"Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Akademie-Verlag Berlin, Pergamon Press Oxford, Vieweg & Sohn, Braunschweig (1968)

(85) Lenormant, H., Baudras, A., Blout, W.R.: JACS 80, 6191 (1958)

(86) Wallach, D.F.H.: Chem.Phys.Lipids 8, 347 (1972)

(87) Chapman, D. , Williams, R.M., Ladbrooke, B.D.: Chem.Phys.Lipids I, 445 (1967)

(88) Ramachandran, L.K.:"Chemical Applications of Infrared Spectroscopy" (Ed. Rao, C.N.R.),Academic Press New York and London (1963)

(89) Chapman, D., Kamat, V.B., Levene, R.J.: Science 160, 314 (1968)

(90) Blout, E.R., Idelson, M.: Am.Chem.Soc. 83, 712 (1961)

(91) Blout, E.R., Idelson, M.: Am.Chem.Soc. 80, 4209 (1958)

(92) Parker, F.S.: "Infrared Spectroscopy", Ed. Adam Hilger, London (1971)

(93) Dechant, J.: "Ultrarotspektroskopische Untersuchungen von Biopolymeren", Akademie-Verlag, Berlin (1972)

(94) Fraser, R.D.B.:"Analytical Methods of Protein Chemistry", (Ed. Bloch, A.P., Bloch, R.J.) Band 2, S. 285, Pergamon Press New York (1961)

(95) Rao, C.N.R. :"Chemical Applications of Infrared Spectroscopy" (Ed. Rao, C.N.R.),Academic Press New York and London (1963)

(96) Thomas, L.C., Chittenden, R.: Spectochimica Acta 20, 489 (1964)

(97) Thomas, L.C. Chittenden, R.: Spectrochimica Acta 20 467 (1964)

(98) Jenkinson, T.J., Kamat, V.B., Chapman, D.: BBA 183 427 (1969)

(99) Thomas, L.C. Chittenden, R.: Chem. and Ind., S.1916 (1961)

(100) Bellamy, L.J., Beecher, L.: J.Chem.Soc.(London) 1951, 1701

(101) Eichberg, J., Whittaker, V.B., Dawson, R.M.C.: Biochem.J. 92, 91 (1964)

(102) Hulcher, F.H.: Archives of Biochem. and Biophys. 100, 237 (1969)

(103) Chapman, D., Wallach, D.F.H.: "Biological Membranes, Physical Fact and Function" (Ed. Chapman, D.), S. 125, Academic Press, London and New York (1968)

(104) Demel, R.A., London, Y., Geurts van Kessel, W.S.M., Vossenberg, F.G.A., van Deenen, L.L.M.: BBA 311, 507 (1973)

(105) Gennis, R.B.: Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 6, 195 (1977)

(106) Kauzmann, W.: Adv.Prot.Chem. 14, 1 (1959)

(107) Rudall, K.M.: Advances in Protein Chemistry 3, 253 (1952)

(108) Handbook of Chemistry and Physics, 40th ed. (Chem. Rubber Publ.Co.)

(109) Chapman, D.:Lipids 4, 251 (1968)

(110) Keidel, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie , Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1970)

(111) Hanahan, D.J.: BBA 300, 319 (1973)

(112) Laskowski, W., Pohlit, W.: Biophysik", Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)

(113) Rouser, G., Nelson, G.J., Fleischer, S., Simon, G.: "Biological Membranes, Physical Fact and Function" (Ed. Chapman, D.), S. 7, Academic Press, London and New York

(114) Wallach, D.F.H., Lin, P.S.: BBA 300, 211 (1973)

(115) Waldron, R.D.: J.Chem.Phys. 26, 809 (1957)

(116) Falk, M., Ford, T.A.: Can.J.Chem. 44, 1699 (1966)

(117) Chapman, D., Kamat, V.B., Levene, R.J.: Science 160, 314 (1968)

(118) Kavanu, J.L: Science 153, 212 (1966))

(119) Walrafen, G.E.: J.Chem.Phys. 36, 1035 (1962)

(120) Nemethy, G., Sheraga, H.A.J.: Chem.Phys. 41, 680 (1964)

(121) Bagly, J.G., Kartha, V.B., Stevens, W.H.: Infrared Phys. 3, 211 (1963)

(122) Hayd, A.: Dissertation, München (1975)

(123) Morris, J.G.: "Physikalische Chemie für Biologen" Verlag: Chemie, Weinheim, New York (1976)

(124) Lis, L.J., Kaufman, J.W., Shriver, D.F.: BBA 406, 453 (1975)

(125) Bachelard, H.S.: "Biochemie des Gehirns". Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart (1975)

(126) Lehninger, A.L.: "Bioenergetik, Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen", Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)

(127) Siehe DFG-Arbeitsbericht vom 25.2.1974, Punkt d zum Antrag Az,. Zu 21/14 vom 16.6.1972

(128) Dr. Strathmann: persönliche Mitteilung

(129) Nachmansohn, D.: Science 168, 1059 (1970)

(130) Fox,J.J., Martin A.E.: Proc.Roy.Soc. (London) A 174 234 (1940)

(131) Hadži, D., Shepperd, N.: Proc.Roy.Soc. 216, 247 (1953)

(132) Zundel, G., Leuchs, M.: persönliche Mitteilung

Lebenslauf

Name:	Jenny Zerfowski
Geburtsdatum und -ort:	18.4.1945 in Drakenburg, Kreis Nienburg/Weser
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Erich Zerfowski, Angestellter, und Frau Betty, geb. Kaminski
Schulbildung:	1951-56 Volksschule 1956-62 Staatl. Mädchenoberschule 1962-65 Staatl. Gymnasium, math.-naturwissenschaftlicher Zweig (Schulort: Bad Kreuznach)
Studium:	1966-73 Studium der Biologie 1973 Diplom (Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Neurochemische Abteilung) 1973-78 Anfertigung der Dissertation am Physikalisch-Chemischen Institut bei Prof. Zundel